Kalziumströme und Lernprozesse in der Entwicklung des visuellen Systems der Katze

Hans Geiger

München ~~1983~~ 1984

Kalziumströme und Lernprozesse in der Entwicklung des visuellen Systems der Katze

Dissertation der Fakultät für Physik der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von Hans Geiger
aus Wessobrunn

München, den 9. August 1983

1. Gutachter Prof. Dr. R. Röhler

2. Gutachter Prof. Dr. Groth

Tag der mündlichen Prüfung 2. März 1984

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung
2.	Methoden
2.1.	Versuchsaufbau
2.2.	Elektrische Reizung
2.3.	Ionensensitive Mikroelektroden
2.4.	Ablauf einer Messung
2.4.1.	Präparation
2.4.2.	Versuchsdurchführung
2.5.	Vorbemerkung zur quantitativen Auswertung
3.	Ergebnisse
3.1.	Antworteigenschaften visueller Neurone
3.1.1.	Quantisierung neuronaler Aktivität
3.1.2.	Wirkung der elektrischen Stimulierung
3.2.	Neuronale Aktivität und extrazelluläres Kalzium
3.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse
3.4.	Diffusionsvorgänge
3.4.1.	Physikalisches Modell
3.4.2.	Mathematische Behandlung der Diffusion
3.4.3.	Einige Beispiele der Modellrechnung
3.4.4.	Anpassung an experimentelle Resultate
3.4.5.	Schlussfolgerungen

4. Diskussion

4.1. Methoden

4.1.1. Auswertung

4.1.2. Mathematische Behandlung der Diffusion

4.2. Interpretation der Ergebnisse

4.2.1. Kalzium

4.2.2. Now-Print-Befehl und neuronale Ensembles

4.3. Funktionelle Bedeutung der Plastizität

A Anhang A Elektronik

B Anhang B Messprogramm

C Anhang C Auswerteprogramm

1. Einleitung

Sehen muss gelernt werden. Die zum Zeitpunkt der Geburt vorhandenen Funktionen des Sehsystems des Menschen sind nur für ganz wenige Aufgaben ausreichend. Alle höheren Leistungen, die über die die Hell/Dunkel - Unterscheidung des Neugeborenen hinausgehen, entwickeln sich erst nach der Geburt, wobei die volle Entwicklung des menschlichen Sehsystems bis zu 16 Jahre dauern kann. Dieser Lernvorgang muss innerhalb dieser Zeit abgeschlossen werden. Danach werden die Grundlagen für die Entwicklung neuer Funktionen abgebaut.

Überzeugende Beweise für diesen Sachverhalt liefern die Untersuchungen von Menschen, die entweder von Geburt an wegen optischer Probleme im Auge nicht zur Aufnahme visueller Signale befähigt waren oder ihr Sehvermögen durch Unfall oder Krankheit während der ersten Lebensjahre verloren und ihre Sehfähigkeit, was die optischen Voraussetzungen angeht, erst als Erwachsene durch eine Operation wiedergewannen. In allen Fällen war es für die Patienten sehr schwierig, sich an die neu- oder wiedergewonnen Fähigkeiten zu gewöhnen. Es konnte aber deutlich zwischen angeborener und erworbener Blindheit unterschieden werden: Diejenigen Patienten, die niemals in ihrem Leben die Auswertung visueller Informationen erlernt hatten, konnten diesen Mangel als Erwachsene kaum mehr ausgleichen. Sie konnten zwar, wenn auch meist nach einer monate - oder jahrelangen Trainingsphase, visuelle Informationen in gewissem Umfang zur Steuerung ihres Verhaltens verwenden, konnten oft sogar Lesen lernen, aber Funktionen wie Tiefensehen, Abschätzen von Entfernungen oder andere höhere Sehleistungen wie Invariantenbildung standen ihnen auch nach langjähriger Gewöhnung nicht zur Verfügung. Je länger andererseits der Patient vor seiner Erblindung die Dekodierung und Verwertung optischer Informationen

erlernt hatte, desto vollständiger war die Wiederherstellung des subjektiven Sehvermögens (siehe Valvo, A. 1971, von Senden, M. 1960). Sind die erlernbaren Funktionen einmal vorhanden, so bleiben sie offensichtlich prinzipiell erhalten und können selbst nach vielen Jahren der Nichtbenutzung wieder " eingeschaltet " werden.

Die Funktionen des Sehsystems werden also erst durch Lernvorgänge entwickelt, wobei diese Lernvorgänge nur während einer zeitlich begrenzten kritischen Periode der Entwicklung möglich sind. In dieser Periode finden offensichtlich bedeutende Veränderungen der Verschaltung von Neuronen des visuellen Systems statt, das Sehsystem zeigt neuronale Plastizität.

Seit dem Nachweis durch Hubel und Wiesel, dass visuelle Erfahrung die Entwicklung des visuellen Systems von Säugetieren ganz allgemein entscheidend beeinflusst, wird dieses System als Modell für die experimentelle Untersuchung neuronaler Plastizität benutzt (siehe z.B. Movshen und van Sluyter, 1981). Ein Beispiel dafür ist die Entwicklung der Binokularität, also der Eigenschaft von Neuronen des visuellen Cortex, auf retinale Aktivität beider Augen zu reagieren.

Zu dem Zeitpunkt, an dem junge Katzen oder Affen ihre Augen öffnen, antworten die meisten Neurone des visuellen Cortex auf Stimulierung von beiden Augen. Bei normaler visueller Erfahrung ebenso wie bei einer vollständigen Deprivation, also dem Entzug jeglicher optischer Reize bei beiden Augen, bleibt dieser Zustand erhalten. Wenn aber Reize angeboten werden, die nicht für beide Augen identisch sind, beispielsweise weil ein Auge verschlossen wird, oder weil die Netzhautbilder der Augen wegen einer Augenfehlstellung (Strabismus , Verdrehung eines Auges etc.) nicht übereinstimmen, verlieren die corticalen Neurone ihre Binokularität. In

diesem Fall können sie entweder nur mehr durch das offene Auge oder im Falle der Augenfehlstellung jeweils nur von dem einen oder dem anderen Auge aktiviert werden.

Wird eine Katze beispielsweise durch Verschliessen eines Auges kurz nach der Geburt monokulär depriviert, so ergibt sich eine massive Verschiebung der okulären Dominanzverteilung (siehe Bild 1A). Der grösste Teil der Neurone wird monokulär , kann also nur durch Reize vom offenen Auge erregt werden (Bild 1B). Diese Modifikation der normalen Emtwicklung durch gezielte Manipulation der visuellen Erfahrung hat nicht nur funktionelle, sondern auch morphologische bzw. anatomische Konsequenzen. Eine histologische Untersuchung des Nucleus geniculatum laterale (= NGL) monokulär deprivierter Katzen zeigt eine deutliche Schrumpfung der Schichten, die dem verschlossenen Auge zugeordnet sind und eine geringe Vergrösserung des Bereichs, der mit dem nicht deprivierten Auge in Verbindung steht (Guillery und Stelzner,1970 Wiesel und Hubel 1963). Eine Studie der Aktivität corticaler Neurone mit radioaktiv markierter Deoxyglucose ergibt eine drastische Schrumpfung der Territorien, die von Neuronen besetzt werden, die mit dem deprivierten Auge in Verbindung stehen. Dies bestätigt die elektrophysiologisch gewonnenen Ergebnisse (Singer, in Vorbereitung).

Neben der Binokularität wurden auch anderer Eigenschaften corticaler Neurone im Hinblick auf ihre erfahrungsabhängige Modifizierbarkeit untersucht. Normalerweise reagieren fast alle Neurone in der Sehrinde erwachsener normaler Katzen vorzugsweise auf Konturen einer ganz bestimmten Orientierung. Zellen mit ähnlicher Vorzugsorientierung treten dabei örtlich gehäuft auf und bilden ein einigermassen gleichmässiges System von Kolumnen oder Bändern gleicher Orientierungspräferenz.

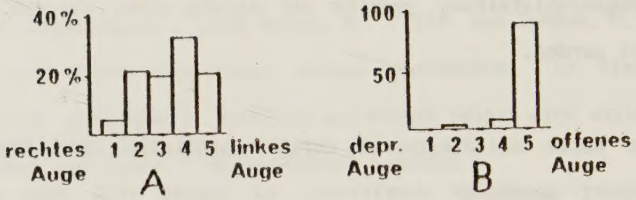


Bild 1 Links normale okuläre Dominanzverteilung, rechts okuläre Dominanzverteilung nach monokulärer Deprivation. Angegeben ist die Prozentzahl der Neurone, die jeweils in eine der 5 Dominanzklassen fallen (Aus Singer, 1982 mit freundlicher Genehmigung des Verfassers).

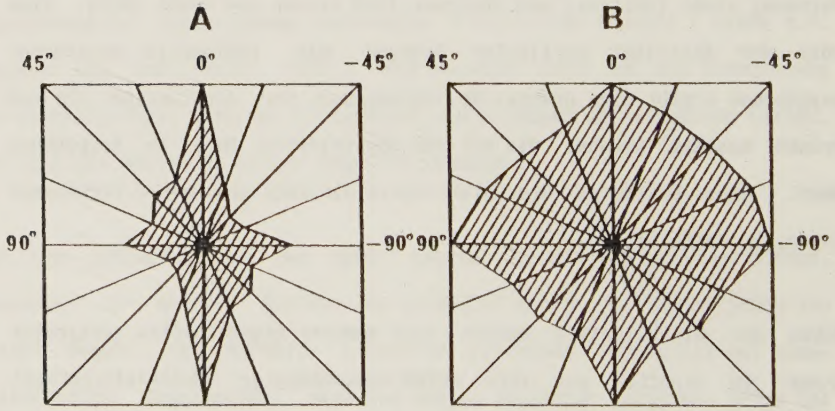


Bild 2 Polardiagramm der Verteilung der Orientierungspräferenzen corticaler Neurone.

A Orientierungsdeprivierte Katze

B Normaler Verteilung der Orientierungspräferenzen

Insgesamt sind alle Vorzugsrichtungen etwa gleich stark vertreten. Wird das Sehen von Konturen während der kritischen Phase durch Dunkelaufzucht oder durch Verschliessen beider Augen (binokuläre Deprivation) verhindert, entwickelt nur ein kleiner Teil der kortikalen Neurone Orientierungsselektivität, der Grossteil reagiert wie bei sehr jungen Katzen gleichermassen auf alle Orientierungen. Zusätzlich nimmt die Antwortgüte der Neurone stark ab, etwa 30% bis 50% reagieren überhaupt nicht mehr auf retinale Stimulierung. Während der kritischen Periode kann dieser Effekt durch das Anbieten normaler visueller Erfahrung vollständig rückgängig gemacht werden. Etwa 8 Stunden normalen Sehens reichen aus, um die Orientierungsselektivität zu normalisieren (Buisseret et al., 1978).

Man kann aber auch die Orientierung der vorliegenden optischen Reize auf einen engen Teilbereich beschränken, indem die Katze entweder in eine rotierende Trommel mit vertikalen Streifen gebracht wird (Singer, 1976 Blakemore und Cooper, 1970) oder indem die Abbildung der Umwelt durch eine dem Auge vorgesetzte Zylinderlinse so verzerrt wird, dass nur Konturen einer vorgegebenen Orientierung scharf auf die Retina abgebildet werden (Cynader und Mitchell, 1977 Hirsch und Spinelli, 1970 Rauschecker und Singer 1979). In beiden Fällen findet man im Cortex eine Verteilung der Orientierungsselektivität (siehe Bild 2B), die sehr deutlich von der Normalverteilung (Bild 2A) abweicht. Der grösste Teil der Neurone bevorzugt die ausschliesslich angebotene Orientierung, es gibt nur wenige Zellen, die auf Konturen anderer Orientierung reagieren. Neuroanatomisch ist dann festzustellen, dass sich die Gebiete im Cortex, die der angebotenen Orientierung entsprechen, stark auf Kosten derjenigen Areale ausgedehnt haben, die normalerweise für andere Orientierungen reserviert gewesen wären. Diese erfahrungsabhängigen Modifikationen finden wieder nur während der kritischen Phase der frühen Entwicklung statt.

Die Mechanismen, die der Veränderung der rezeptiven Felder corticaler Neurone zugrundeliegen, sind noch weitgehend unbekannt. Es wurden bisher änderungen der Kopplungsfaktoren synaptischer Verbindungen, selektive Stabilisierung oder Abbau bestehender Verbindungen und aktivitätsabhängige Wachstumsprozesse in Betracht gezogen. Was es auch immer sein mag, fest steht, dass die Aktivierung des postsynaptischen Neurons notwendig für die längerdauernde Veränderung der excitatorischen Verbindungen ist. Aus einer Reihe von Experimenten in dieser Richtung wurde der Schluss gezogen, dass diese Modifikationen Regeln folgen, die den von Hebb aufgestellten Gesetzmässigkeiten weitgehend entsprechen (Hebb, 1949). Die "Hebb-Synapse" ist eine Modellvorstellung für die bei Lernvorgängen an einem Neuron ablaufenden Veränderungen synaptischer Effizienz. Bei der betrachteten Synapse handelt es sich um die Verbindung zwischen dem Axon eines Eingangs- und dem Dendriten eines nachgeschalteten postsynaptischen Neurons. Letzteres weist in der Regel zusätzlich zu dieser Afferenz noch weitere aktivierende und/oder hemmende Eingänge auf. Die für die Änderungen dieser Verbindungen aufgestellten Regeln können folgendermassen zusammengefasst werden:

1) Wird eine Afferenz zeitgleich mit der postsynaptischen Zielzelle aktiviert, so wird die Effizienz der betreffenden Synapse verbessert.

2) Diese Effizienz nimmt ab, falls die postsynaptische Zelle aktiviert wird, während die präsynaptische Afferenz inaktiviert ist.

3) Unabhängig von der Aktivität der präsynaptischen Terminalen ergeben sich keinerlei Änderungen,wenn die Afferenz aktiviert wird, während die postsynaptische Zelle inaktiv ist.

Hier ist anzumerken, dass die " Aktivität " der postsynaptischen Zelle nicht unbedingt aus Aktionspotentialen bestehen muss, sondern dass auch postsynaptische dendritische Depolarisationen als Antwort genügen können. Diese relativ einfachen Regeln reichen bereits aus, um eine Vielzahl von plastischen Phänomenen weitgehend zu beschreiben.

Einige Untersuchungen neueren Datums geben Hinweise darauf, dass die Aktivierung des postsynaptischen Neurons nur eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für das Auftreten Hebbscher Veränderungen im visuellen Cortex ist. Selbst wenn das Sehen angebotener Konturen unbehindert vor sich gehen kann und retinale Signale deutliche Antworten der Neurone des visuellen Cortex hervorrufen, kann eine erfahrungsabhängige Modifikation erregender Verbindungen trotzdem ausbleiben. So bleiben etwa Neurone der Sehrinde trotz monokulärer Deprivation binokulär, wenn kurz vor Beginn der monokulären Deprivation der Norepinephringehalt (NE) im Cortex stark herabgesetzt wird. Lokale Applikatione von NE im corticalen Gewebe setzt die plastischen Prozesse wieder in Gang. Eine normale Konzentration von NE ist aber nicht unbedingt notwendig für corticale Plastizität: Wird die NE - Verringerung bereits einige Wochen vor dem Beginn der monokulären Deprivation begonnen, werden die corticalen Neurone genauso monokulär wie unter normalen Bedingungen. Andere, bisher nicht identifizierte Faktoren können also offensichtlich den Ausfall des NE kompensieren.

Man kann auch noch weitere notwendige Einflüsse auf plastische Prozesse experimentell nachweisen. Dazu dienen Experimente, bei denen bei identischer visueller Umwelt andere Bedingungen variiert werden. Unter verschiedenen Bedingungen treten dann unterschiedliche Modifikationen des visuellen Systems auf. So wurden beispielsweise junge Katzen monokulär

depriviert und unter Narkose für eine bestimmte Zeit visueller Erfahrung ausgesetzt. Dieser Zeitraum w r so bemessen, dass sich bei wachen Tieren in dieser Zeit bereits die Merkmale der monokulären Deprivation gezeigt hätten. Aus anderen Studien ist bekannt, dass in narkotisiertem und/oder gelähmten Zustand die im Cortex ankommenden Signale nur wenig gegenüber dem Wachzustand verändert sind (Livingston und Hubel, 1980). Bei den narkotisierten Tieren zeigten sich aber lediglich die Zeichen einer binokulären Deprivation (Singer und Rauschecker, 1982 Singer,1979). Unter diesen Umständen werden die im Cortex ankommenden Informationen nicht für die Modifikation und Verbesserung der Sehleistung verwendet.

Ein ähnlicher Effekt kann dadurch erzielt werden, dass während der kritischen Periode der frühen Entwicklung die propriozeptiven Afferenzen der Augenmuskeln oder die Motilität der Augen an sich zerstört wird (Buisseret et al, 1978 Buisseret und Gary-Bobo, 1979). Auch hier wird die Entwicklung der Sehleistungen stark gestört, während ein ähnlicher Eingriff bei erwachsenen Tieren so gut wie keinen Effekt auf die bereits erlernten Sehvorgänge hat.

In einem anderen Versuch (Singer et al, 1982a) wurde ein Auge vor Abschluss der kritischen Phase wie bei den Untersuchungen zur monokulären Deprivation verschlossen, das offenbleibende jedoch operativ um 90 Grad gedreht, ohne dass dessen Funktionsfähigkeit beeinträchtigt wurde. Selbst Augenbewegungen traten nach dem Wiederanwachsen der betroffenen Augenmuskeln wieder auf. Trotzdem wiesen diese Tiere keine Anzeichen einer monokulären Deprivation auf, sondern glichen binokulär deprivierten Tieren. Die Signale des rotierten Auges wurden also, trotz ungestörter Verbindungen von der Retina zum Cortex durch ein multimodales, übergeordnetes System auf Grund anderer Informationen als unbrauchbar

unterdrückt und damit nicht zur Modifikation der kortikalen Verschaltung verwendet. Es ergab sich also funktionell gesehen der Eindruck vollständiger binokulärer Deprivation. Dieser Effekt konnte teilweise verhindert werden, wenn man die Katzen durch Unterbringen in einer völlig neuen Umgebung dazu zwang, die Informationen des rotierten Auges zur Orientierung zu verwenden. Auch dies ist wieder ein Effekt, bei dem identische visuelle Eingänge wegen differierender anderer Informationen unterschiedliche Auswirkungen auf die Modifikation des visuellen Systems haben. In weiteren Versuchen wurden die physiologischen Grundlagen der zusätzlich notwendigen Signale näher untersucht.

Wie oben erwähnt, werden durch die völlige Ausschaltung der "Aufmerksamkeit " auf pharmakologischem Weg, also durch Narkose, alle Einflüsse etwaiger visueller Informationen auf die plastischen Prozesse im ZNS verhindert. Da sich die Wirkung der Pharmaka unselektiv auf das gesamte ZNS bezieht, liegt der Versuch nahe, durch gezielte Ausschaltung einzelner Zentren die Grundlagen dieser Effekte näher zu lokalisieren. So wurde z.B. durch einseitige Läsionen im Bereich des medialen Thalamus (Singer 1982a) gezeigt, dass dieser Bereich eng mit selektiver Aufmerksamkeit zusammenhängt: Die so behandelten Tiere zeigten in ihrem Verhalten eine deutliche Vernachlässigung aller dem entsprechenden Halbraum zugeordneten Ereignisse (Hemineglect). Eine monokuläre Deprivation führte in der normalen Hemisphäre erwartungsgemäss dazu, dass sich fast ausschliesslich monokuläre Neurone entwickelten. In der von der Läsion betroffenen Hemisphäre blieben die Zellen des Cortex hingegen zum grössten Teil binokulär mit dem bei binokulärer Deprivation zu erwartenden Antwortverhalten. Die auf dieser Seite auftretenden Signale hatten also, obwohl das visuelle System völlig intakt war, keinerlei (oder zumindest stark verminderten) Einfluss auf die plastischen Vorgänge dieser

Hemisphäre.

Dem Umkehrschluss zufolge haben also die hier zerstörten intralaminären Kerne des medialen Thalamus eine steuernde Wirkung auf plastische Vorgänge im ZNS. Da der ganaue Wirkungsmechanismus vermutlich mehrstufig und über mehrere hierarchische Ebenen hinweg verläuft, kann allerdings keine Aussage darüber gemacht werden, ob dieses Areal seinen Einfluss nun direkt (etwa über Steuerungen von Relais-Eigenschaften irgendwelcher Neurone) oder mehr indirekt (etwa durch unspezifische Erhöhung und Erniedrigung von Aktivitätsschwellen) ausübt. Aus anatomischen Daten liegt für die erwähnten Thalamuskerne allerdings die Vermutung nahe, dass ihr Einfluss einigermassen spezifisch und direkt ist.

Einen weiteren Hinweis für die Annahme, dass Strukturen des Diencephalon bei der Vermittlung der für die Auslösung plastischer Vorgänge notwendigen permissiven Signale beteiligt sind, wird durch Experimente mit elektrischen Reizen geliefert. Eine Aktivierung von diencephalischen Strukturen kann beispielsweise durch elektrische Reize geschehen, die durch entsprechend plazierte Reizelektroden appliziert werden (siehe auch 2.2). Wie der folgende Versuch zeigt (Singer und Rauschecker, 1982), kann die Kombination von monokulärer optischer Reizung und elektrischer Stimulierung diencephalischer Kerne Veränderungen der okulären Dominanz hervorrufen.

Jungen Katzen (4 bis 5 Wochen alt), die im Dunkeln aufgewachsen waren, wurden monokuläre Lichtreize über eine Dauer von 10 bis 12 Stunden angeboten, während sie unter Narkose standen. Während im wachen Tier dieser Zeitraum monokulärer Reizung bereits zum vermehrten Auftreten monokulärer Neurone im Cortex führt. , wäre, wie oben erwähnt, bei den

narkotisierten Tieren keinerlei Verschiebung der okulären Dominanz zu erwarten. Zusätzlich wurden aber Reizelektroden entweder in intralaminären Kernen des medialen Thalamus (NIL) oder in der mesencephalischen Formatio Reticularis (MRF) plaziert (siehe Bild 3). Über diese Elektroden wurden jeweils vor der Darbietung des optischen Stimulus eine Serie elektrischer Reize appliziert (genaueres siehe Bild 4B). Im Gegensatz zu den Kontrolltieren, die identische optische Reize ohne elektrische Aktivierung erhielten, wurde bei allen so behandelten Katzen eine deutliche Verschiebung der okulären Dominanz zum offenen Auge hin festgestellt (siehe Bild 4A). Auch die Veränderung der Antwortgüte war ähnlich, wie sie bei wachen , monokulär deprivierten Tieren beobachtet werden kann. Die elektrische Stimulierung ist also in der Tat geeignet, die oben erwähnten permissiven Kontrollsignale zu substituieren.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass retinale Aktivität nur dann die Entwicklung corticaler Funktionen beeinflusst, wenn das Tier diese Aktivität auch beachtet und zur Kontrolle seines Verhaltens benützt. In Bezug auf die oben erwähnte Hebb-Synapse bedeutet dies allerdings, dass diese einfachen Auswahlregeln nicht ausreichen, um die unterschiedliche Behandlung lokal identischer Aktivitätsmuster zu erklären. Man muss sie deshalb um einen Zusatz erweitern, der besagt, dass die Veränderungen synaptischer Effizienzen nur dann stattfinden, wenn zusätzlich ein zentrales Steuersignal auftritt. Dieses bewertet unter Berücksichtigung anderer als lokal verfügbarer Informationen,ob solche Veränderungen im jeweiligen Verhaltenskontext sinnvoll sind (permissives Signal oder "Now-Print" Befehl, siehe Singer 1980 b). Dieses Signal scheint jedoch so globaler oder unspezifischer Natur zu sein, dass die Hebbschen Regeln nach wie vor zur Beschreibung lokaler Vorgänge hinreichen. das globale

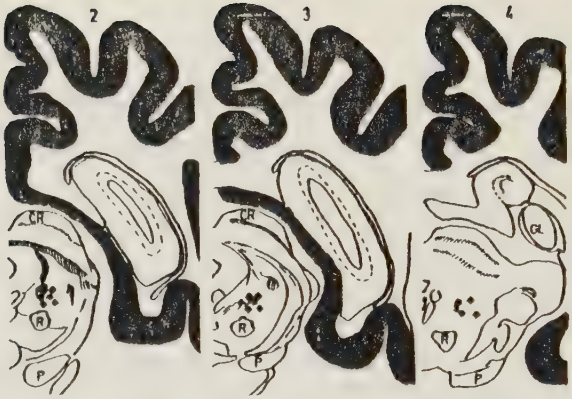


Fig. 3 Histologically verified stimulation sites in the mesencephalic reticular formation (A-c) and the intralaminar nuclei of the thalamus (D,E). The locations of the electrode tips are indicated by squares. The numbers on the graphs correspond to the frontal plane of the section.Abbreviations: CL=n.centralis lateralis, CM=n.centralis medialis, CR=superior colliculus, GL=lateral geniculate, LA=n.lateralis anterior, LMI=lamina medullaris interna, LP=n.lateralis posterior, M.=n. medialis dorsalis, R=n.ruber, p=pyramidal tract.

Bild 3 Aus Singer und Rauschecker (1982) (Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers).

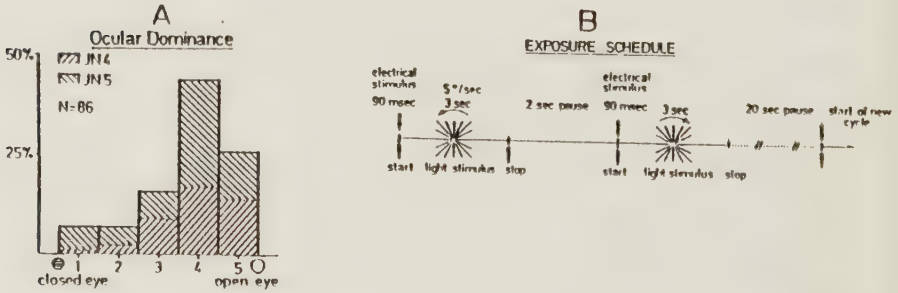


Fig.2 A. Ocular dominance distribution of single cells in area 17 after 18 h of conditioning monocular light stimulation paired with electrical stimulation of medial thalamus. Data is shown from 2 kittens, JN4 and JN5.

B. Schematic representation of the exposure schedule for monocular light stimulation. The conditioning light stimulus consisted of a star pattern that rotated around its center and in addition moved along a circle (diameter=15 deg) around the visual axis of the stimulated eye. Thus, all orientations appeared successively at any point within this circle. The conditioning electrical stimuli lasted 90 msec and were applied each time the pattern started to rotate.

Bild 4 Aus Singer und Rauschecker (1982) (Mit freundlicher Genehmigung des Verfassers).

"Now-Print" - Signal ermöglicht oder verhindert unabhängig vom lokalen Aktivitätsmuster generell das Auftreten Hebbscher Modifikationen.

Die Natur dieses Signals ist im wesentlichen noch unbekannt. Es konnte auch noch nicht entschieden werden, ob es durch mehrere, voneinander unabhägige Systeme generiert wird oder ob alle globalen Einflüsse über eine gemeinsame Endstrecke laufen. Mit grosser Wahrscheinlichkeit ist der allen nachgewiesenen Einflüssen gemeinsame Effekt eine verstärkte Depolarisationen der dendritischen Membran corticaler Neurone. Das Überschreiten der Plastizitätsschwelle hängt also vermutlich mit den Spannungsänderungen der Membran zusammen, wobei dieser Zusammenhang ein anderes Schwellenverhalten aufweist als die mit gewöhnlichen Aktionspotentialen verbundenen Ionenleitfähigkeiten. Nun gibt es tatsächlich einen dendritischen, spannungsgesteuerten Prozess, der eine Schwelle zeigt, die höher als die der Na- abhängigen Aktionspotentiale liegt. Dies ist die Aktivierung dendritischer Ca - Kanäle. Man kann also als Arbeitshypothese annehmen, dass adaptive Veränderungen als Antwort auf retinale Stimulierung letztlich durch die intrazelluläre Akkumulation von Ca - Ionen ausgelöst werden, die durch spannungsabhängige Ca - Kanäle in das Neuron einströmen. Falls die Aktivierung dieser Kanäle die Voraussetzung für Hebb'sche Modifikationen ist, steht zu erwarten, dass immer dann, wenn die Reizparameter geeignet für die Auslösung adaptiver Veränderungen sind, Ca in die Zellen einströmt. Dieser Einstrom sollte einen transienten Abfall des extrazellulären Ca zur Folge haben.

Es gibt einige Gesichtspunkte, die diesen Zusammenhang plausibel erscheinen lassen:

Die Aktivierung der Ca - Kanäle zusätzlich zu den normalen Ionenleitfähigkeiten ist durch verschiedene, auch nicht-retinale Einflüsse

modifizierbar und kann deshalb gut als gemeinsame Endstrecke für die Wirkung auch nichtvisueller Afferenzen in Betracht gezogen werden.

Wegen der sehr geringen intrazellularen Ca - Konz. kann das einströmende Ca im Cytosol des Neurons verschiedene wichtige Vorgänge auslösen (Messengerfunktion, siehe z.B. Kretsinger, 1981). In Invertebraten wurden solche Ca -Leitfähigkeiten bereits vor längerer Zeit sowohl in vivo als auch in Slice - Präparationen und in Zellkulturen gefunden (Geduldig und Junge, 1968, Geduldig und Grüner, 1970; Kostyuk et al 1974, 1977, Eckert und Lux 1976; Horn 1977, Kandel 1981). Über die Regulierung des axoplasmatischen und möglicherweise auch des dendroplasmatischen Transports kann Kalzium steuernd in Auf- und Abbauvorgänge der Membran eingreifen. Ebenso kann es durch Veränderung der Viskosität von Axo- und Dendroplasma die Motilität der Zellen steuern (Porter, 1976, Hodgkin und Katz, 1949).

Es ist seit längerem bekannt, dass sich entwickelnde Neurone viele Ca - Kanäle enthalten, die später grösstenteils wieder verschwinden (Llinas und Sugimori, 1979). In neuerer Zeit wurden mit einer Verbesserung der Untersuchungsmethoden auch an Vertebratenneuronen ähnliche Entdeckungen sowohl im Slice (Dichter und Fischbach, 1977) als auch in der Kultur (Moolenar und Spector, 1977) und in vivo (Purpura,1967) gemacht.

Im Cerebellum wurde bereits eine Ca - abhängige und heterosynaptisch gesteuerte Veränderung synaptischer Transmissionseigenschaften gefunden, die unter funktionell ähnlichen Bedingungen zu aktivieren ist (Ito, Sakurai und Tongroach, 1982).

Auch bei in-vivo Experimenten wurden, beispielsweise im Motorcortex der Katze (Heinemann und Pumain, 1980) Hinweise gefunden, dass (neben dem

Einströmen von Ca in die präsynaptischen Terminale) weiter Ca -Kanäle existieren, durch die Ca in die Zellen gelangen kann.

Diese Überlegungen führen zu folgender Arbeitshypothese:

Jedes Auftreten von plastischen Veränderungen im visuellen Cortex junger Katzen ist mit einer Aktivierung postsynaptischer Ca - Kanäle verbunden. Diese Ca - Kanäle werden genau dann aktiviert, wenn die angebotenen Reize so beschaffen sind, dass die Hebbschen Regeln sowie die zusätzlich geforderten Bedingungen hinsichtlich des Aktivierungszustands der nicht-retinalen Kontrollsysteme erfuellt sind. Die Aktivierung der Kanäle sollte sich in einer transienten Verringerung der extrazellulären Calciumkonzentration zeigen, wobei diese Verringerung in einer physiologisch relevanten Grössenordnung liegen muss. Das intrazellulär einfliessende Ca muss ausreichen, um biochemischen Vorgänge auszulösen. Bei erwachsenen Katzen sowie bei Reizparametern, die nicht zur Auslösung plastischer Prozesse geeignet sind, dürfen keine Ca - Aktivitäten messbar sein.

2. Methoden

In diesem Abschnitt sollen die bei den durchgeführten Versuchen angewandte Techniken erläutert sowie die dafür angefertigten Geräte und Computerprogramme geschildert werden. Die exakte Beschreibung der Elektronik sowie der verwendeten Programme findet sich im Anhang.

Spezielles Augenmerk gilt den hier verwendeten ionensensitiven Mikroelektroden (ISM's), da deren Eigenschaften wichtig für die Interpretation der Resultate sind. Durch die Beschreibung eines Versuchsablaufs wird die Anwendung der einzelnen Apparate bzw. Programme erläutert.

2.1. Versuchsaufbau

Der prinzipielle Aufbau der Versuchsanordnung ist in Bild 5 dargestellt. Das Versuchstier wird nach der Präparation (siehe Punkt 2.4.) auf dem Versuchstisch plaziert und an die verschiedenen Überwachungs- und Versorgungseinheiten angeschlossen. Falls es der Versuch erfordert, können elektrisch betätigte Augenklappen angebracht werden, die eine monokuläre Reizdarbietung erlauben. Die optischen Reize werden entweder mit einer Handlampe manuell auf eine vor dem Versuchstisch befindliche Projektionswand erzeugt oder es werden auf einem an Stelle der Projektionswand befindlichen X/Y- Display entsprechende Muster generiert. Die Ansteuerung dieses Displays geschieht über eine im Rahmen dieser Arbeit erstellte Elektronik, die die computergesteuerte Darstellung beliebiger Gitter oder Einzelbalken mit beliebiger Orientierung erlaubt. Zusätzlich kann über diese Elektronik auch der Reizverteiler und ein Relais - Interface angesteuert werden (näheres im Anhang A). Bei einem

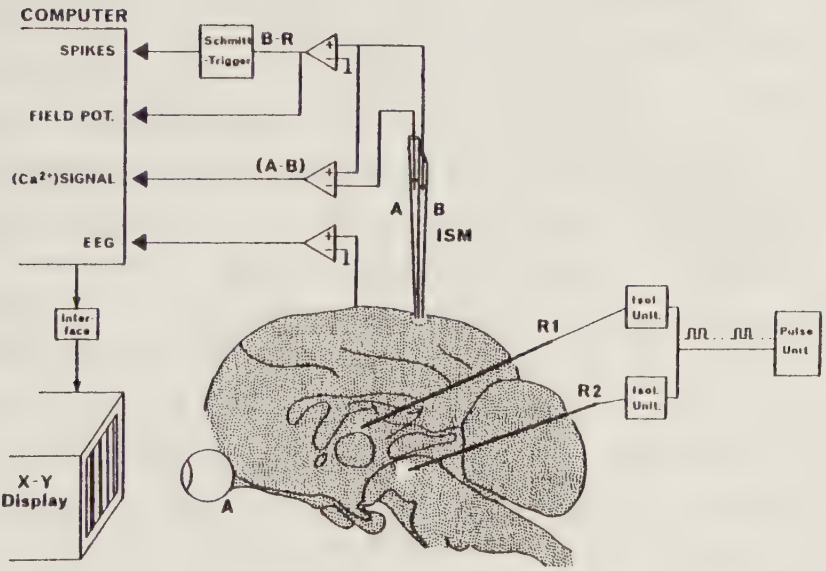


Bild 5 Versuchsaufbau. A ist das Auge der Versuchskatze, R1 und R2 sind die Reizelektroden, die im medialen Thalamus (R1) bzw in der Formatio reticularis (R2) befindlich sind. Die ionensensitive Mikroelektrode (ISM) befindet sich etwa in Area 17 des visuellen Cortex der linken Hemisphäre.

Teil der Versuche wird auch eine durch die Taktgebereinheit gesteuerte optische Bank zur Projektion bewegter Lichtbalken verwendet.

Ein Blockschaltbild der elektrischen Verbindungen ist in Bild 6 gezeigt. Bei den Vorverstärkern handelt es sich um Ausführungen mit sehr hohem Eingangswiderstand (grösser als 500 Gigaohm), die wegen der hohen Impedanzen der ionensensitiven Mikrölektroden (ISMs) notwendig sind. Das Ausgangssignal dieser Verstärker (Verstärkungsfaktor 10, gleichspannungskgekoppelt) wird durch Differenzbildung zu den Messignalen (A-B) und (B-R) verarbeitet (siehe Bild 6). Diese Spannungen werden ihrerseits in einigen Nachverstärkereinheiten (Tektronix - Verstärkereinschübe, AMP1 bis AMP4 in 6) gefiltert (1 - 30 kHz für (B-R), DC bis 3 kHz für (A-B)) und dem für die Datenaufnahme notwendigen Niveau angepasst. Da das Analogbandgerät Eingangsspannungen von +/- 2.5 V verarbeitet und der Eingangsspannungsbereich der Analog/Digitalwandler des Rechners +/- 5 V beträgt, wird die Nachverstärkung von AMP1 bis AMP4 so gewählt, dass sich die Ausgangsspannungen meistens zwischen +1 und -1 V bewegt. Die Datenaufnahme geschieht parallel auf ein Analogmagnetbandgerät mit 7 Kanälen, von dem die Daten nach dem Versuch zur Auswertung abgespielt werden können, und über einen mehrkanaligen Digital/Analog - Wandler und einen Zählereingang direkt in den Computer. Dies erlaubt die vorausgewertete Darstellung der Versuchsergebnisse während des Versuchs, wie beispielsweise Mittelungen neuronaler Antworten, die ansonsten möglicherweise nicht sichtbar gewesen wären (siehe auch Punkt 3.1.).

Das Mitverfolgen der gemessenen Werte ist möglich einmal über einen Speicheroszillographen, der an die Ausgänge der Verstärker AMP1 bis AMP4 angeschlossen ist und zum anderen über das vom Computer gesteuerte

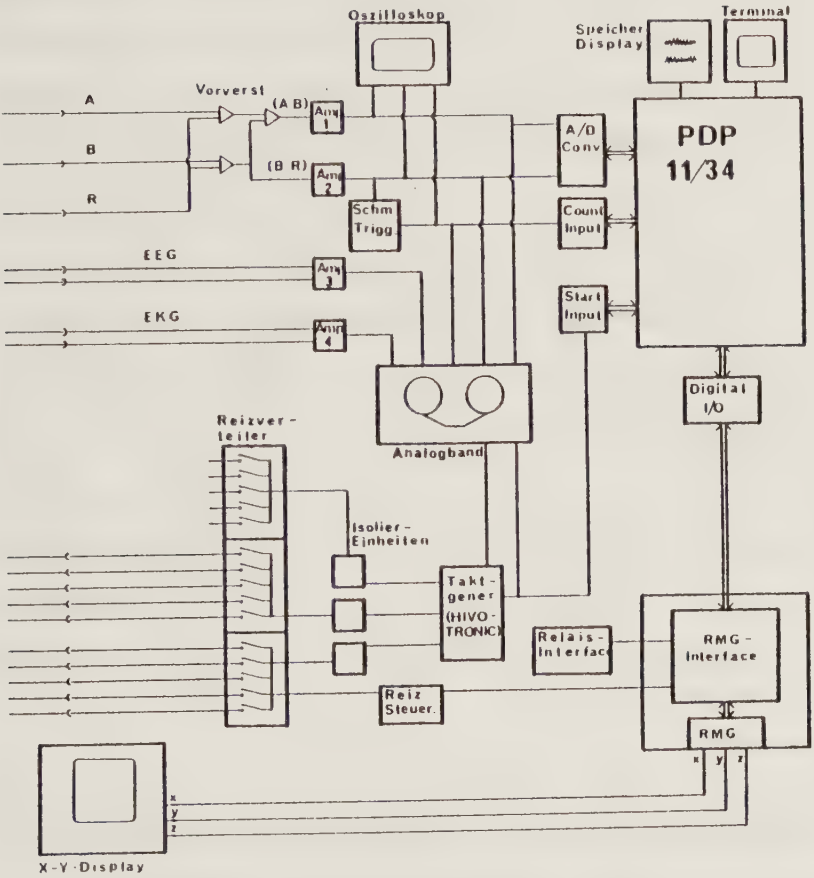


Bild 6 Blockschaltbild des Versuchsaufbaus. AMP1 bis AMP4 Vorverstärker, RMG-Interface ist das Reizmustergenerator-Interface (Beschreibung siehe Anhang A).

Tektronix - Speicherdisplay. Auf diesem können die gerade gemessenen Werte sowie zwischen den einzelnen Messungen die aufsummierten, gemittelten oder auf andere Weise aufbereiteten Daten vorhergehender Messungen dargestellt werden. Die für die Durchführung der Messungen sowie die Auswertung der gewonnenen Daten notwendigen Programme wurden ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit erstellt (siehe Anhang C). Das Messprogramm kann Daten aus bis zu 16 Analogkanälen sowie einem Zähler (zur Ermittelung der Zahl der Aktionspotentiale des Neurons) gleichzeitig mit verschiedener zeitlicher Auflösung aufnehmen. Zugleich steuert es über die angeschlossene Elektronik den Reizverteiler, der die elektrischen Reize (erzeugt von der Taktgeneratoreinheit und den Isoliereinheiten, siehe Bild 6) auf die ausgewählten Reizelektroden schaltet. Ausserdem wird durch den Bildsteuerteil des Programms während der Datenaufnahme (asynchron zu der interruptgetriebenen Messwerterfassung) die Darstellung der optischen Reize auf dem X/Y - Display gesteuert. Diese Darstellung wird durch die oben erwähnte Elektronik ermöglicht, die mit einer Bildwiederholfrequenz von 100 Hz (notwendig wegen der relativ hohen Flimmerverschmelzungsfrequenz des visuellen Systems der Katzen) Gitter oder Balken (allgemein rechteckige Formen beliebiger Grösse) mit einer beliebigen Orientierung auf dem Display erzeugt. Die Schaltbilder der Elektronik sowie die Programme sind mit einer näheren Beschreibung im Anhang zusammengefasst.

Die zeitliche Steuerung des Versuchsablaufs sowie die Erzeugung der Impulsfolgen für die elektrische Reizung wird durch ein HIVOTRONIC - System übernommen. Dieses System erzeugt aus einer quarzstabilen Zeitbasis Triggersignale in beliebigen Abständen und Wiederholraten. Für diese Versuche wurden, ausgehend von einem Startimpuls (TO -Trigger) nach durch Schaltereinheiten einstellbaren Verzögerungszeiten zwei

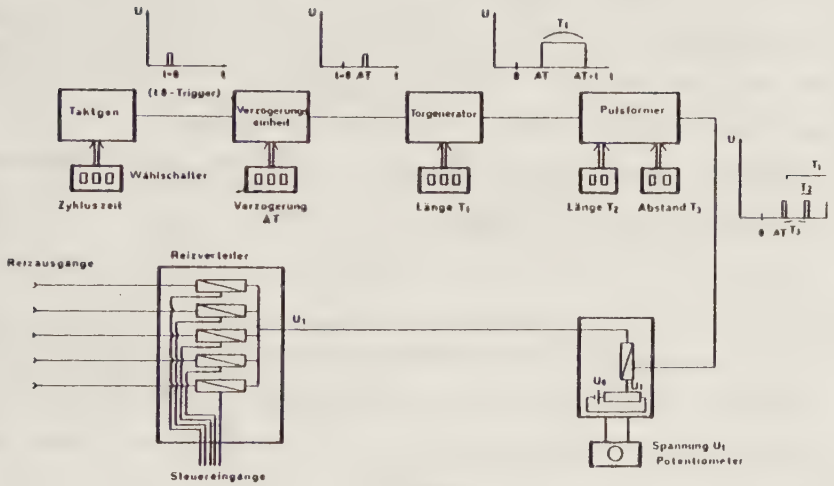


Bild 7 Schaltung der Reizerzeugungseinheit. Es wird hier ein Impulszug erzeugt, der nach einer gewissen Verzögerungszeit nach dem Startsignal t_0 beginnt, eine Zeit T_1 andauert und aus Impulsen der Länge T_2 im Abstand T_3 besteht. Die Spannung U_1 der resultierenden Impulse kann mit einem Potentiometer eingestellt werden, die Verteilung dieser Spannungspulse auf die Reizausgänge durch den Reizverteiler kann durch die Steureingänge ausgewählt werden.

Impulszüge aus Nadelimpulsen von 50 us Breite und einer Wiederholfrequenz von 100 Hz erzeugt, die etwa 490 ms lang waren (siehe Bild 7). Diese Impulse (TTL - Pegel, also etwa 5 V Amplitude) werden zur Ansteuerung einer Isolationseinheit benutzt, in der sie über ein Reed - Relais eine vorgewählte Spannung (Bereich 0 bis +/- 100 V, typischerweise ca. 0.6 bis 10 V) auf den Ausgang dieser Einheit schaltet. Diese Ausgangsspannung wird dann über den Reizverteiler (siehe Bild 6) auf eine von 5 möglichen Ausgängen verteilt und aktiviert die an diesen Ausgang angeschlossene Reizelektrode. Da diese Einheiten in dreifacher Ausfertigung vorhanden sind, können so im Prinzip drei voneinander unabhängige Reize auf je 5 Ausgänge verteilt werden.

Die Datenaufnahme auf das Analogbandgerät wird von Hand gestartet, wenn interessante Resultate zu erwarten sind. Die Daten der Bänder werden dann später wieder mit dem Computermessprogramm ausgewertet. Die 7 Kanäle des Analogbandes sind folgendermassen belegt

Kanal 1	Kalzium-Signal (Spannung A-B in 6)
Kanal 2	Signal der Referenz-Elektrode (B-R in Bild 6)
Kanal 3	EEG - Ableitung
Kanal 4	EKG - Ableitung
Kanal 5	Ausgang Schmitt-Trigger (Identifikation der APs)
Kanal 6	Hilfstrigger T1 (nicht benutzt)
Kanal 7	Startimpuls T0, markiert Beginn des Durchgangs

Der Computer nimmt im Normalfall die Signale von Kanal 1, 2 und 3 auf, da die anderen Kanäle nicht von direktem Interesse sind. Typischerweise läuft eine Messung über 20 Sekunden, und es werden 1000 Messpunkte für

eine Messreihe bzw. 500 Bins für die Registrierung der Aktionspotentiale verwendet. Die meist über 5 bis 10 identische Durchläufe gemittelten Messwerte werden dann auf dem Massenspeicher des Computers abgelegt.

Die Ableitelektrode (Einzelheiten dazu siehe Punkt 2.3.) wird in einem Elektrodenhalter montiert und mit diesem durch einen Kreuztisch grob über der geplanten Ableitstelle positioniert. Ein Schrittmotor bewegt die Elektrode dann nach Abschluss der Vorbereitungen (siehe Punkt 2.4.) innerhalb des Zielgebietes auf und ab.

Der sehr hohe Widerstand der ISMs bedingt eine grosse Anfälligkeit gegen Störimpulse. Deren Einfluss kann weitgehend dadurch verringert werden, dass um den Kopf des Versuchstieres eine Abschirmung aus Kupferdraht angebracht wird. Dadurch kann der Elektrodenbrumm auf ein erträgliches Minimum reduziert werden.

2.2. Elektrische Reizung

Bei den Reizelektroden handelt es sich in der Regel um konzentrische, bis zur Spitze hin isolierte Metalldrähte (siehe Bild 8), die einzeln oder zu mehreren in Elektrodenhaltern befestigt sind. Mit diesen Haltern können die Elektroden an allen stereotaktischen Koordinaten des Gehirns plaziert werden. Die stereotaktischen Koordinaten des entsprechenden Gebiets werden einem anatomischen Atlas entnommen (z.B. Topographischer Hirnatlas der Katze von Fernando Reinoso-Suarez, 1961) und die Elektroden werden so auf einem stereotaktischen Kopfhalter befestigt, dass sie reproduzierbar in diese Position gebracht werden können. Im Experiment werden die Elektroden dann nach Präparation des Tieres in das ausgewählte Areal eingebracht. Bei nicht genau lokalisierbaren, schwer zu findenden Strukturen werden nicht einzelne sondern mehrere in kurzem Abstand nebeneinander montierte Elektroden verwendet. Die genaue Position der Elektroden bzw die am besten plazierte von mehreren Elektroden kann im Experiment noch aus ihrer Wirkung ermittelt werden. So ruft beispielsweise eine Reizung der MRF Augenbewegungen hervor, die durch Veränderungen der Elektrodenposition optimiert werden können.

Die Art der verwendeten elektrischen Reize wurde bereits beschrieben. Die Spannungspulse werden meist an Innen- und Aussenleiter einer Elektrode angelegt, wodurch die Wirkung des Reizes einigermassen lokal beschränkt bleibt. Bei den Elektroden zur Reizung des NIL wurden bei einigen Versuchen die Reizspannungen zwischen zwei benachbarten (Abstand etwa 2-3 mm) Elektroden angelegt. Dadurch wurde ein wesentlich grösseres Gebiet erfasst, was einige Male zu einer Verbessserung der Wirkung führte.

Die Position der Elektroden wird nach Abschluss des Experiments durch

eine Läsion durch Anlegen einer hohen Gleichspannung über einige Sekunden markiert. Diese Stelle ist dann durch histologische Untersuchung des entstprechend geschnittenen Gehirns im Mikroskop auffindbar, wodurch die genaue Position der Elektroden bestimmt werden kann.

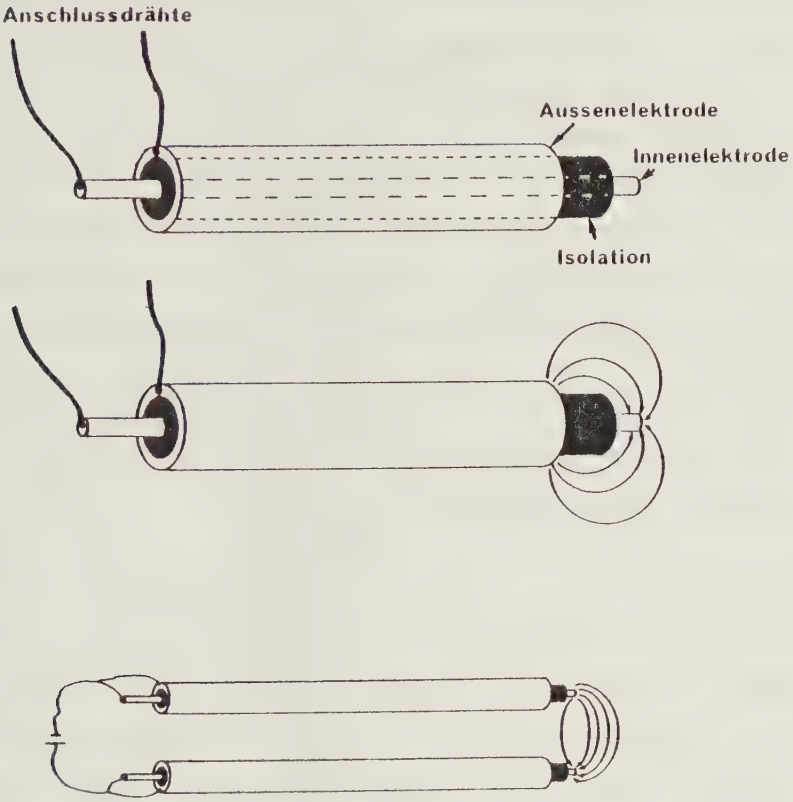


Bild 8 Reizelektrode. Oben: prinzipieller Aufbau einer konzentrischen Elektrode. Mitte: Feldverlauf bei konzentrischer Reizung mit einer Einzelelektrode. Unten: Feldlinienverlauf bei Benützung von zwei Elektroden. Das beeinflusste Gebiet ist hier wesentlich grösser als bei Einzelelektroden.

2.3 Ionensensitive Mikroelektroden

Die Herstellung der Ca -sensitiven Mikroelektroden erfolgt nach einem von Neher und Lux 1973 angegebenen Verfahren. Dazu werden doppelläufige Elektroden mit einer eingeschmolzenen Trennwand (sogenanntes Theta - Glas) verwendet. Einer der beiden Kanäle wird zur Vermeidung von Flüssigkeitsbrücken um etwa 5 bis 7 mm verkürzt (siehe Bild 9). Dabei entstehende Glassplitter werden durch Druckluft entfernt und die Bruchkanten werden in einer Bunsenbrennerflamme gerundet. Das Glas wird in konz. Chromschwefelsäure gereinigt und unter pH - Kontrolle in destilliertem Wasser gespült. Anschliessend werden die Kanäle mit Azeton durchgespült und getrocknet und die Enden mit Parafilm verschlossen. Die Elektroden werden dann mit einem normalen Elektrodenziehgerät gezogen. Unter Mikroskopkontrolle werden die Spitzen auf einen Spitzendurchmesser von etwa 1-3 um zurückgebrochen. Dies ist notwendig, da sonst das Einsaugen des Ionenaustauschers nicht möglich ist.

Die Referenzseite der Elektrode wird mit 154 mM NaCl gefüllt, es wird ein chlorierter Silberdraht als Kontakt eingebracht und mit Hartwachs befestigt. Die Füllung der ionensensitiven Seite besteht aus 100 mM $CaCl_2$, auf dieser Seite wird ein zu einer dünnen Spitze ausgezogener Teflonschlauch ebenfalls mit Hartwachs eingegossen. Unter einem Stereomikroskop wird dann 3 bis 5 Mal eine Trimethylchlorsilanlösung (5% in CCl_4) in die Spitze eingesaugt, indem der angeschlossene Schlauch abwechselnd zum Ansaugen an eine Wasserstrahlpumpe und zum Ausblasen an eine Pressluftleitung angeschlossen wird (Umschaltung über zwei Magnetventile). Nach der so erfolgten Lipophilisierung der Glaswand dieser Seite wirde der Ca -Ionenaustaucher (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor W. Simon, TH Zürich) auf eine Höhe von

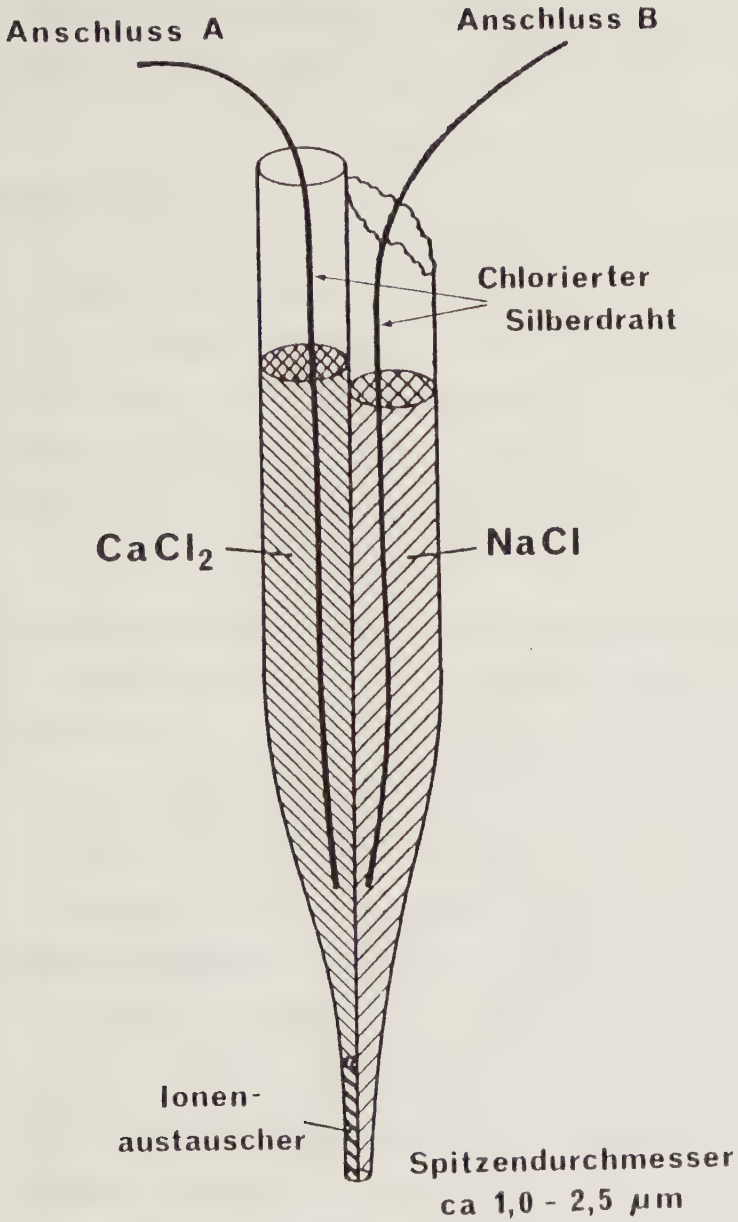


Bild 9 Ionensensitive Mikroelektrode (ISM).

etwa 80 bis 120 um eingesaugt. Der Teflonschlauch wird durch einen chlorierten Silberdraht ersetzt und die Elektrode auf ihre Sensitivität getestet.

Für diesen Test wird sie in der Schaltung von Bild 6 an einen Verstärker mit hohem Eingangswiderstand angeschlossen (grösser als 500 Gigaohm). Die Widerstände der Elektroden betragen typischerweise etwa 20 bis 60 Mohm auf der Referenzseite und 5 bis 30 Gigaohm für die sensitive Seite. Die Sensitivität wird mit Eichlösungen einer Konzentration von 0.5 bis 10 mM $CaCl_2$ (jeweils in 154 mM NaCl) getestet, wobei auch das Zeitverhalten überprüft wird. Es werden nur Elektroden verwendet, deren Empfindlichkeit etwa 27 bis 29 mV pro Dekade beträgt.

Die an der ionensensitiven Seite zu messende Spannung ist die Summe des aussen anliegenden Potentials und des Diffusionspotentials, das proportional zum Logarithmus des Verhältnisses der Ca -Konzentrationen auf den beiden Seiten des Ionenaustauschers ist (Nernst - Potential). Durch die Differenzbildung mit dem Signal der Referenzelektrode, die nur das normale Potential der Umgebung misst, erhält man dadurch das Diffusionspotential. Zugleich werden dadurch auch viele Störeinflusesse, die beide Seiten gleichermassen beeinflussen, elimininiert (externe Störspannungen, Netzbrumm etc.). Dies gelingt allerdings nicht vollkommen, da die Widerstände der beiden Seiten und vor allem ihr Zeitverhalten unterschiedlich sind. Die unterschiedlichen Widerstände können durch Veränderungen der Verstärkung ausgeglichen werden, während das Zeitverhalten durch eine innerhalb des Verstärkers vorgesehene positive kapazitive RÜckkoppelung (C - Kompensation) angeglichen werden kann. Dadurch ergibt sich ein weitgehend von Potentialschwankungen unabhängiges Signal (Spannung (A-B) in Bild 6), und gleichzeitig kann das Signal der Referenzelektrode (Spannung (B-R) in 6) zur Verfolgung der

Aktivität der zu untersuchenden Neurone und zur Bestimmung von Feldpotenitalen verwendet werden. Das indifferente Bezugspotential 'R' ist das Erdpotential des Versuchstieres, gemessen über eine Ag/Agcl - Elektrode, die in der Mundschleimhaut oder an der Nackenmuskulatur angebracht ist.

2.4. Ablauf einer Messung

In diesem Punkt wird der Ablauf eines Experiments im einzelnen geschildert. Die Präparation des Versuchstieres erfolgte nach Standardmethoden und soll deshalb nur kurz skizziert werden. Etwas genauer wird dann der Ablauf einer Messung mit Reizerzeugung (sowohl visuell als auch elektrisch) und Datenerfassung erklärt.

2.4.1. Präparation

Die anfängliche Betäubung für die operative Präparation der Katzen geschah mit Ketanest (Anfangsdosis 20 mg/kg, intramuskulär injiziert). In eine Beinvene wurde ein Katheter eingeführt, über den die Narkose durch weitere Gaben von Ketanest und später durch eine Dauerinfusion von Nembutal aufrecherhalten wurde. Nach Freilegen und Eröffnen der Luftröhre wurde eine Trachealkanüle zur künstlichen Beatmung eingeführt. Ohrstifte, eine Beisstütze und Augenhaltern fixierten das Tier in der stereotaktischen Halterung. Zwei Nadelelektroden ermöglichten eine EKG - Ableitung, die Temperatur wurde über eine Sonde gemessen und über ein Heizkissen gegebenenfalls korrigiert. Ebenso konnte der CO_2 - Gehalt der Ausatemluft sowie der Atemdruck kontinuierlich überwacht werden. Das Tier wurde mit einem Lachgas/Sauerstoffgemisch (Verhältnis 70 zu 30) beatmet.

Zur Vorbereitung der Messungen wurde der Schädelknochen freigelegt und die Öffnungen für die Reiz- Ableit- und EEG- Elektroden gebohrt. Die EEG - Elektrode bestand aus einem Silberdraht, der am Ende zu einem Kügelchen geschmolzen worden war. Dieser Silberball wurde durch das dafür gebohrte Loch auf die Dura über dem Cortex aufgesetzt, die Öffnung wurde verschlossen und der Silberdraht an den EEG - Verstärker angeschlossen. Als indifferente Elektrode diente dafür eine in die Nackenmuskulatur

eingestochenen Nadel. Dieses EEG diente zur Überwachung des allgemeinen Zustands des Tieres, der Narkosetiefe sowie der Wirkung der el. Reize und zur Messung evozierter Potentiale.

Im Anschluss daran wurden die Reizelektroden angebracht, die Bohrungen ebenfalls wieder abgedichtet und die Elektroden angeschlossen. Die Position der Reizelektroden wurde dadurch optimiert, dass die Reaktion (Augenbewegungen, Veränderungen des EEG) auf die el. Reizung beobachtet wurde. Daraufhin wurden die Katzen durch Addition von Imbretil zur Dauerinfusion gelähmt und die Ableitelektrode angebracht. Die Ernährung der Tiere erfolgte während des Versuchs über eine Magensonde mit einer Mischung aus Lävulose und Ringer.

Vor Beginn des eigentlichen Versuchs wurde noch die Optik der Augen überprüft. Eventuelle Fehlsichtigkeiten, festgestellt mit einem Refraktometer, wurden durch Linsen korrigiert und der Zustand der Retina wurde mit einer Funduskamera überprüft. Mit Hilfe dieses Apparats wurde auch die Position der Fovea auf dem Projektionsschirm festgestellt.

2.4.2. Versuchsdurchführung

Nach Abschluss dieser Vorbereitungen wurde die Ableitelektrode schrittweise in den Cortex eingeführt. Wurde dabei ein aktives Neuron im Messbereich der Elektrode entdeckt, wurde mit Hilfe der Handlampe das rezeptive Feld RF des Neurons auf dem Projektionsschirm gesucht. Nach der Klassifizierung des RF nach Lage und Vorzugsorientierung wurde der Schirm entfernt und an seiner Stelle das X/Y - Display so plaziert, dass das RF des zu untersuchenden Neurons auf ihm zu liegen kam. Bei Benutzung der der optischen Bank anstelle des Displays wurde der damit erzeugte Lichtbalken durch Verstellen der Spiegel und Prismen so justiert, dass er sich über das RF bewegte. Daraufhin wurden die Antwortcharakteristika sowie die Reaktion des Neurons auf die elektrischen Reize überprüft, wobei hier bereits die ersten Daten durch den Computer, das Analogtonband oder beide gesammelt wurden. Hier war die rechnergestützte Auswertung durch Mittelung mehrerer Durchgänge oft behilflich, eine Antwort aus evt. vorhandenen grossen Spontanaktivitätsschwankungen herauszufiltern oder des RF genauer nach Art und Position zu bestimmen. Dadurch war dann auch die Optimierung der fazilitierenden el. Reize leichter möglich.

Durch repetitives Anbieten der Kombination von visuellem und elektrischem Stimulus, immer wieder unterbrochen durch Kontrollmessungen (entweder Leermessungen ganz ohne Stimulus oder nur mit dem Lichtreiz bzw. dem el. Reiz alleine) wurde dann versucht, Veränderungen der gemessenen extrazellulären Ca -Konzentration zu erreichen. Falls möglich, wurden auch die Eigenschaften des Neurons auf Veränderungen hin untersucht (siehe Punkt 3.). Diese Messungen gingen wie folgt von sich:

Die HIVOTRONIC - Takteinheit erzeugte nach dem Starten den Triggerimpuls T0. Dieser Trigger startete über einen Trigger - Eingang das

Datenerfassungsprogramm im Computer und gleichzeitig den Reizmustergenerator, der das vorher eingegebene Muster zu einem bestimmten Zeitpunkt über das RF des Neurons laufen liess. Dieses Muster bestand gewöhnlich aus einem Lichtbalken einer bestimmten Grösse, Breite und Orientierung. Parallel dazu erzeugte die Taktgeneratoreinheit in der bereits besprochenen Weise eine Impulsfolge, die über den Reizverteiler die Reizelektroden aktivierte. Das Messprogramm bestimmte durch Umschalten des Reizverteilers. welche Elektroden eingeschaltet wurden. Ein Tektronix - Speicherdisplay zeigte während der Messung die gerade gemessenen Werte. Nach Ablauf der Messzeit, typisch 20 Sekunden, erzeugte der Taktgenerator erneut ein TO - Signal und startete eine neue Messung. Die hier erfassten Daten wurden auf die des ersten Durchgangs aufsummiert. Dies ermöglichte eine Mittelwertbildung über prinzipiell beliebig viele Durchgänge. Nach Ablauf der vorher gewählten Anzahl von Mittelungen schaltete der Computer alle Reize ab und speicherte die Resultate der Messung auf dem Massenspeicher ab. Diese Resultate konnten dann auf dem Speicherdisply betrachtet und teilweise verarbeitet und ausgewertet werden.

Auf diese Weise erfasste eine Messreihe zwischen 3 und 10 Neurone. Nach Abschluss eines solchen Tracks wurde die Elektrode herausgezogen und erneut auf ihre Ionensensitivität hin überprüft. Dann wurde entweder dieselbe oder eine andere Elektrode in einer etwas veränderten Position wieder angebracht und die nächste Penetration begonnen.

Die Aufnahme der Daten auf das Analogbandgerät diente dazu, bei der Auswertung der Versuchsergebnisse eine nachträgliche genauere Erfassung ausgewählter Bereiche zu ermeoglichen, etwa die Zerlegung gemittelter Daten in Einzelmessreihen (siehe Bild 11) oder die Analyse einzelner Vorgänge mit erhöhter Zeitauflösung.

Nach Abschluss der Versuche wurden die Orte der Reizelektroden wie schon erwähnt durch eine starken Strompuls markiert, die Tiere wurden durch eine Überdosis Nembutal getötet und zur Gewebefixierung perfundiert. Anschliessend folgte das Freipräparieren des Gehirns, das gefriergeschnitten und auf die Plazierung der Reizelektroden mikroskopisch untersucht wurde. Die gesammelten Daten konnten dann mit Hilfe des Auswerteprogramms (siehe Anhang) verarbeitet, geordnet und über eine Hardcopy- Einrichtung in Form von Kurven bzw als Tabelle ausgegeben werden.

2.5. Vorbemerkung zur quantitativen Auswertung

Bei Messungen an biologischen Systemen ist es oft schwierig, sich aus der grossen Menge der messbaren Daten diejenigen auszusuchen, die sinnvolle Aussagen über das zu untersuchende Problem zulassen. Ein wichtiges Hilfsmittel für die Beurteilung grosser Datenmengen ist eine numerische Vorverarbeitung dieser Daten etwa durch einen Digitalrechner. Eine notwendige Voraussetzung dafür ist die reproduzierbare Quantifizierung von Daten verschiedener Versuchsreihen. Schon die Mittelwertbildung zur Verbesserung des Signal-Rausch-Abstandes setzt voraus, dass die numerischen Ergebnisse mehrer zeitlich getrennt verlaufender Versuche in ihrer Bedeutung gleichgesetzt werden können. Hier stösst man aber auf grundlegende Probleme: Die Zahlen, die aus einem Versuch durch eine eindeutige Messvorschrift gewonnen werden, sind oft weit von den Ergebnissen entfernt, die der Experimentator durch " Betrachtung " derselben Daten gewinnt. Man " sieht " beispielweise in einer Serie von PST-Histogrammen (in denen die Antwort einer Zelle als die Anzahl der Aktionsptentiale als Funktion der Zeit festgehalten wird) eine systematische Veränderung der Antwort, die bei einer Auswertung des

Parameters " Aktionspotentiale/Zeiteinheit " völlig in der Messungenauigkeit untergeht. Andererseits ist aber die Sichtung einer grossen Datenmenge auf das auftreten solcher Veränderungen hin genau die Art von Routinearbeit, für die ein Computer ideal geeignet ist.

Dieses Problem lässt sich in vielen Fällen durch eine Abänderung der Messvorschrift umgehen. Man definiert sich zu diesem Zweck einen Parameter als Funktion von einer oder mehrerer Messgrössen. Dieser Parameter soll dann als Zahlenwerte dieselbe Aussage liefern wie die auf dieses Problem orientierte Auswertung der ursprünglichen Daten. Beispiel: Die "Antwort" eines Neurons auf einen bestimmten Reiz hin wird meistens als Anzahl der Aktionspotentiale pro Zeiteinheit festgelegt. Statt dessen kann man sich einen Antwortparameter PA folgendermassen festlegen:

Dem zu untersuchenden Neuron wird ein vorher als optimal festgelegter Reiz angeboten, während kontinuierlich die Aktionpotentiale in einer bstimmten, gegenüber der Gesamtantwort kleinen Zeiteinheit (Binbreite bei der Aufnahme eines Antworthistogramms) gezählt werden. Dabei muss sich die Beobachtung über einen Zeitraum erstrecken, der gross ist sowohl gegenüber der Darbietungszeit des Reizes als auch gegenüber der möglichen Dauer der Antwort darauf. Nun sei

$$(1) \qquad PA = \frac{(A(t1,t2)-So*(t2-t1))}{(t2-t1)}$$

$$\text{mit} \qquad So = \frac{(A(to,t1)+A(t2,t3))}{(t1-to)+(t3-t2)}$$

und to Beginn , t3 Ende des Beobachtungszeitraums,
t1 und t2 Beginn und Ende der Antwort.

sowie A(ti, tj) die Anzahl der gezählten Aktionspotentiale in der Zeit von ti bis tj (siehe auch Bild 10).

Die Zeitpunkte t1 und t2, die die Antwort begrenzen, können bei geeigneter Versuchsanordnung und Fragestellung vom Experimentator festgelegt werden, sie können aber auch dadurch bestimmt werden, dass sie, ausgehend von einem sicher zu grossen Intervall, (das also die Antwort sicher enthält) sukzessive aufeinanderzu bewegt werden, bis der maximale Wert für PÅ erreicht wird (die Existenz dieses Maximums ist auch für streng tonische Antworten durch die Quadrierung des Zählers in (I) gesichert).

Neben der oben gegebenen Definition für Pa lassen sich aber genauso andere Parameter für andere Fragestellungen festlegen, für die im allgemeinen folgende Vorteile zu erwarten sind:

Die Quantifizierung von Versuchsergebnissen lässt eine sinnvolle Bearbeitung grosser Mengen von Daten zu. Dabei bleibt jederzeit die Beziehung zur funktionellen Bedeutung der Parameter ebenso wie zur subjektiven Bewertung durch den Experimentator erhalten. Andererseits kann der subjektive, qualitative Eindruck, der keinen Vergleich nicht exakt identischer Versuchsergebnisse zulässt, durch Zahlenwerte ersetzt werden, die objektive Vergleiche verschiedener Experimente ermöglichen.

Die im wesentlichen freie Wahl der Paramterdefinitionen lässt die Anpassung an verschiedenste Probleme und Fragestellungen zu.

Insgesamt erbringt die Versuchsauswertung nach obigem Ansatz selbstverständlich keinerlei wirklich neue Erkenntnisse gegenüber der herkömmlichen qualitativen Auswertung hervor. Gerade in Verbindung mit der

elektronischen Verarbeitung grosser Datenmengen kann jedoch der Überblick über die Arbeit des Auswerteprogramms und vor allem auch über die tatsächliche Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse erleichtert werden.

Bild 10 Zur Definition des Antwortparameters PA. Dargestellt ist die Antwort eines Neurons auf einen optischen Reiz.Das Intervall von T_1 bis T_2 ist das Anfangsintervall, von dem ausgehend das optimale Intervall T_1' bis T_2' bestimmt wird. Die normierte Spontanaktivität SP_0 wurde im Intervall von T_2 bis T_3 bestimmt.

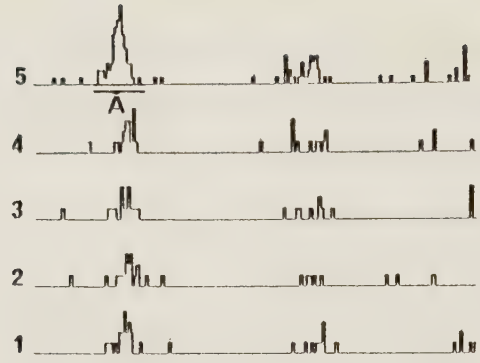
3. Ergebnisse

Die hier gezeigten Daten stammen aus Versuchen mit 4 erwachsenen und 10 jungen Katzen (ca. 4 bis 6 Wochen), bei denen insgesamt 210 Neurone in Area 17 des visuellen Cortex einer Hemisphäre näher untersucht wurden. Von diesen Neuronen wurden 25 zur quantitativen Auswertung herangezogen. Dass der Anteil der auswertbaren Neurone so klein ist, hat versuchstechnische Gründe, die in der Diskussion noch näher erläutert werden sollen. Es muss aber vorausgeschickt werden, dass die Einschränkung der Auswertung auf die relativ wenigen gut verwertbaren Resultate keine Verzerrung der Schlussfolgerungen bedeutet. Eine ganze Reihe von Zellen lieferten qualitativ ähnliche, aber nicht quantitativ auswertbare Resultate und es wurden in keinem Fall Ergebnisse erzielt, die einen Widerspruch zur Grundtendenz der restlichen Auswertungen dargestellt hätten.

Die meisten dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus mehreren Versuchsdurchläufen mit identischen Bedingungen. Die Zulässigkeit der Summation einzelner Messungen wird hier deshalb kurz aufgezeigt. Die Abbildung 11 zeigt einzelne Antworten einer Zelle (Histogramme der Anzahl der Aktionspotentiale während eines Durchlaufs sowie die dazugehörigen Ca -Signale). Die Antworten sind alle ähnlich genug , um ohne Veränderung der Aussage aufsummiert werden zu können (jeweils oberste Spur in Bild 11), wodurch dann vor allem für die Ca - Messungen das Signal - Rausch - Verhältnis stark verbessert wird. Die oberste Reihe zeigt dieselbe Messung, aber mit einer Messzeit von 20 statt 10 s und einem um den Faktor 3 verkleinerten Abbildungsmasstab. In dieser Darstellung ist die Ca -Antwort deutlicher zu erkennen als bei in der Abbildung mit stärkerer

Zeitauflösung. In beiden Messreihen zeigt aber die Betrachtung der Einzelmessungen, dass der Ca -Abfall nicht auf einer zufälligen Abweichung beruht, sondern tatsächlich eine reproduzierbare Antwort des Neurons auf den jeweiligen Reiz darstellt.

Da keine Zellen gefunden wurden, die ein zu diesen Ergebnissen widersprüchliches Verhalten zeigten, werden im folgenden " typische " Versuchsergebnisse als Beispiel für die qualitativ ähnlichen Resultate anderer Versuche erläutert.



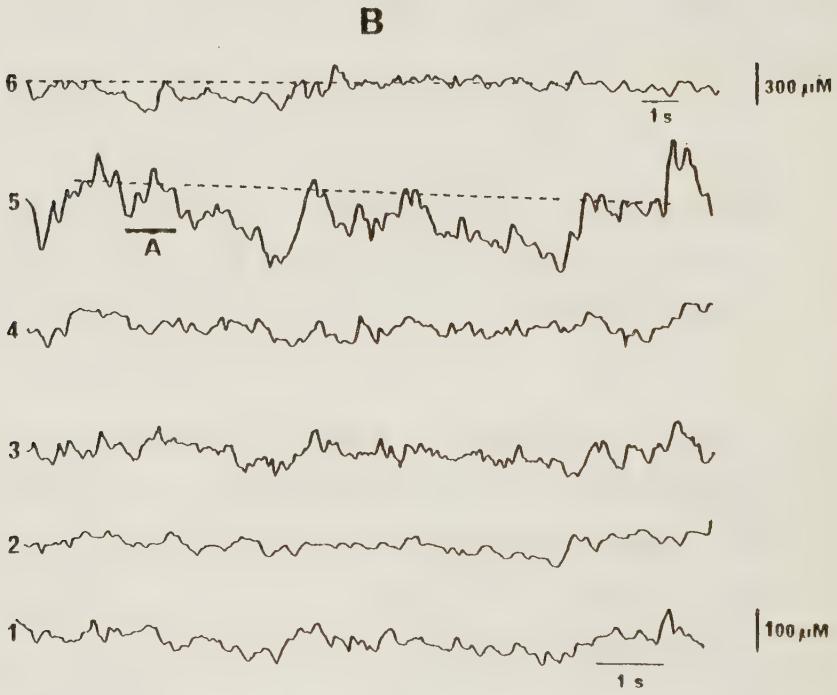


Bild 11 Mittelwertbildung durch Summation von EInzelsignalen.
A Einzelhistogramme (Reihen 1 bis 4) und deren Summe (Reihe 5).
B Einzelne Ca-Signale (Reihe 1 bis 4) und deren Summe (Reihe 5). Der Mit A markierte Balken in Reihe 5 entspricht der gleichen Markierung der Antwort in Reihe 5 von A. Reihe 6 zeigt zur Verdeutlichung dieselbe Messung wie 5, aber mit 20 s Messzeit statt 10 s und mit reduzierter Verstärkung.

3.1. Antworteigenschaften visueller Neurone

Die Auswirkung elektrischer Reizung auf die Aktivität der untersuchten Neurone sowie die Modifikation der neuronalen Antwort auf spezifische visuelle Stimuli wird in diesem Punkt qualitativ und quantitativ dargestellt. Da für die quantitative Auswertung der in Punkt 2. definierte Antwortparameter PA verwendet wird, soll zunächst die Zulässigkeit und Zweckmässigkeit dieser Anwendung belegt werden.

3.1.1. Quantisierung neuronaler Aktivität

In Bild 12 wird die Aktivität eines Neurons als die Anzahl der Aktionspotentiale pro Zeiteinheit in Form eines Histogramms dargestellt. Dazu werden während eines Versuchsdurchlaufs jeweils die in einer Zeiteinheit (= 'Bin', typisch zwischen 10 und 50 Millisekunden) auftretenden Aktionspotentiale gezählt und anschliessend als Balkenhistogramm als Funktion der Zeit aufgetragen. In den hier gezeigten Ergebnissen wurden wie oben erwähnt die Resultate mehrerer Versuchsdurchläufe zur Verbesserung des Signal/Rausch - Verhältnisses aufsummiert. Links von den Kurven sind die für den jeweiligen Versuchsdurchlauf (bzw. für die summierten Durchläufe) geltenden Reizbedingungen angegeben, während rechts die Ergebnisse der numerischen Auswertung festgehalten sind. Diese bestehen, wie in Punkt 2. angegeben, aus dem errechneten Antwortparameter PA und dem rechten und linken Rand I1 und I2 des Intervalls, in dem dieser Parameter bestimmt wurde (als Nummer des betreffenden Bins). Zusätzlich wird die auf ein Bin normierte Spontanaktivität SPo und (zu Vergleichszwecken) die Anzahl der in dem Antwortintervall gezählten Aktionspotentiale SA dargestellt. Die drei übrigen Spalten geben den Antwortparameter PA sowie den rechten und linken Rand des Antwortintervalls für die zweite Antwort des Neurons, I3 und I4

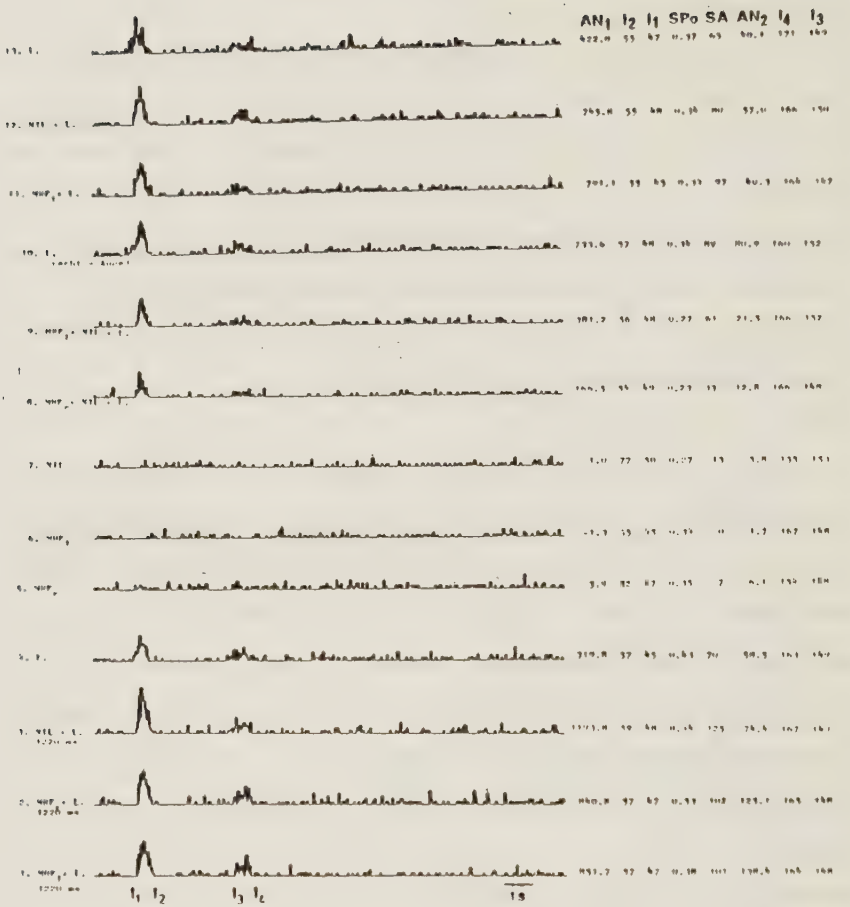


Bild 12 Antworthistogramme einer Zelle bei verschieden Reizkonfigurationen. Die Angaben links geben die Reizparameter an (L = Licht, MRF und NIL el. Reize). In der Tabelle rechts neben den Histogrammen sind die berechneten Antwortparameter der ersten (AN_1) und der zweiten (AN_2) Antwort des Neurons (beim Zurücklaufen des Lichtbalkens über das rezeptive Feld) angegeben. I_1 und I_2 geben das Intervall an, in dem AN_1 berechnet wurde, I_3 und I_4 dasselbe für die zweite Antwort AN_2 (jeweils die Nummer des Bins, die Gesamtlänge ist 500 Bins). SP_0 ist die auf ein Bin normierte Spontanaktivität, SA ist die Anzahl der Aktionspotentiale im Intervall I_1 bis I_2.

an. Diese wurde durch den in der Gegenrichtung über das rezeptive Feld laufenden Lichtreiz ausgelöst. Der elektrische Reiz, falls vorhanden, wurde nur vor Beginn der ersten Antwort gegeben (Beginn etwa nach 1220 ms, Dauer 490 ms, siehe auch Markierung in Bild 12). Es wurde über jeweils 5 Durchgänge von 20 Sekunden Dauer mit identischer Reizkonfiguration summiert. Bei den Antworten mit vorhergehendem elektrischem Reiz wurde der linke Rand der Antwort durch das Ende des Reizes vorgegeben, bei allen anderen wurde sowohl der linke als auch der rechte Rand mit dem Auswerteprogramm durch die Maximumssuche bestimmt (siehe Punkt 2.5.). Zur Errechnung der Spontanaktivität wurde das Intervall von Bin 180 bis 499 benützt, was einer Zeit von 7.2 bis 19.96 Sekunden entspricht (siehe auch Angaben in der untersten Spur von Bild 12).

Ein Vergleich der rechnerisch ermittelten Intervallgrenzen (2. und 3. bzw 7. und 8. Spalte) zeigt, dass diese gut mit den in den Histogrammen sichtbaren Antwortbereichen übereinstimmen. Die für die Kontrolldurchgänge ohne Lichtreiz gefundenen Bereiche ergeben sich durch zufällige Verteilungen, was auch durch die sehr kleinen errechneten PA's dokumentiert wird (Reihen 5 bis 7). Für die tatsächlich evozierten Antworten ergibt die Grösse von PA ein sehr gutes Mass für die relative Grösse der Antwort. Zusätzlich aber erlaubt das gefundene Antwortintervall AI noch eine weitergehende Beurteilung der Art der Antwort. So wird beispielsweise bei Vergleich der Reihen 2 und 4 ebenso wie bei 11,12 und 13 die Verbreiterung der 2. Antwort durch eine entsprechende Vergrösserung von AI wiedergegeben. Wichtig ist hierbei, dass die Verhältnisse der Amplituden gleichbleiben: obwohl AI2 für Reihe 13 wesentlich grösser ist als für 11, sind die zugehörigen PA's gleichgeblieben. Andererseits ist PA für Reihe 12 immer noch deutlich grösser als für 13, obwohl AI von 13 kleiner ist.

Der Parameter PA ermöglicht also einen quantitativen Vergleich verschiedener Histogramme und erübrigt die manuelle Auswertung. Zusätzlich ergeben sich noch andere Informationen, die bei einer Betrachtung der Anzahl der Aktionspotentiale in einer vorgegebenen Zeiteinheit vollkommen verlorengehen können. Dies zeigt sich besonders bei Untersuchungen an Neuronen hoher Spontanaktivität, wie dem in Bild 13 gezeigten. Hier ist bei näherer Betrachtung die Antwort auf den Lichtreiz alleine (Reihe 2 in 13), die transiente Erhöhung der Spontanaktivität unmittelbar nach einem el. Reiz (Reihe 4 und 8) sowie die Fazilitierung der Lichtantwort durch einen vorhergehenden el. Reiz (Vergleich von Reihe 2 mit Reihe 1,5 und 6) noch sichtbar. Ebenso ist eine allmähliche Verschlechterung der Antwort auf den Lichtreiz alleine feststellbar. Hier ist ausnahmsweise die Spontanaktivität als Folge der el. Reizung transient erhöht, was eine Antwort des Neurons vortäuscht. Dass es sich dabei nicht um einen Artefakt handelt, geht daraus hervor, dass das Ende der elektrischen Reize vor dem Beginn der in Reihe 1 zweifelsfrei identifizierbaren Lichtantwort liegt (Siehe dazu auch Punkt 3.1.2.) Ein Vergleich der Aktionspotentiale oder auch der Frequenz der APs (also Anzahl der APs pro Zeiteinheit) liefert in diesem Fall ebenfalls ein falsches Bild, da wegen der in Spur 2 hohen Spontanaktivität die Antwort scheinbar besser ist als die in Spur 5 und 6, welche deutlich fazilitiert sind. Die Parameter PA hingegen geben diese Verhältnisse richtig wieder.

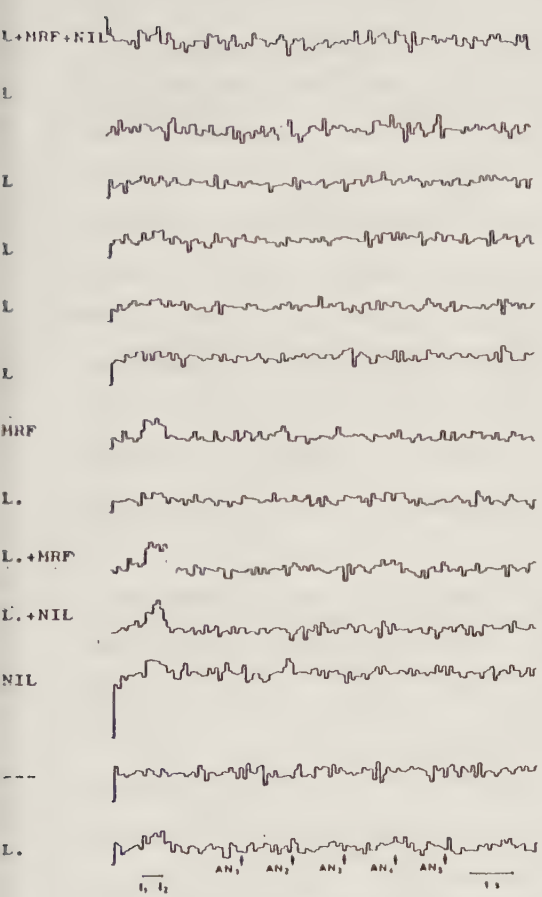


Bild 13 Histogramme einer Zelle mit hoher Spontanaktivität. Links neben den einzelnen Histogrammen sind die Reizparameter angegeben, rechts die Angaben zur numerischen Auswertung. Erklärung dazu siehe Bild 12. Zusätzlich sind in Reihe 1 die Intervalle AN_1 bis AN_5 eingezeichnet, in denen die "Leerantworten" berechnet wurden (siehe Tabelle 1).

Bei der Auswertung dieser Zelle tauchen einige Grenzfälle auf, in denen die Antwort auch durch Betrachtung der Histogramme nicht mehr zu identifizieren ist (möglicherweise wie die enorm hohe Spontanaktivität auch eine Folge eines ungünstig eingestellten Pegels am Schmitt-Trigger, der zum Herausfiltern der APs aus dem Signal der Referenzelektrode verwendet wird). Von einem vernünftigen Algorithmus ist zu fordern, dass er in solchen Fällen ein Ergebnis liefert, das zweifelsfrei als negativ interpretiert werden kann. Tatsächlich liegen die für diese Fälle errechneten ANs deutlich unter denjenigen, die bei " vernünftigen " Antworten errechnet werden, wie in Bild 13, Reihe 3 bereits gezeigt wurde. Um diesen Punkt noch weiter zu klären wie auch um einen ungefähren Eindruck von der statistischen Schwankungsbreite der AN unter ungünstigen Verhältnissen zu gewinnen, wurde in Intervallen von jeweils 30 Bins Breite rechts von den auftretenden Antworten (ohne Optimierung des linken Randes) nach PAs gesucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 dargestellt (jeweils nur die PAs). Es zeigt sich, dass in fast allen Fällen die Grösse der PAs nicht vergleichbar mit den in Bild 13 errechneten tatsächlichen Antworten ist. Selbst die in Reihe 10 - 13 nur mehr schlecht erkennbaren Antworten werden noch richtig von der zufälligen Verteilung im weiteren Verlauf unterschieden. Nur in Reihe 8 ist keine schlüssige Entscheidung möglich, aber hier ist auch im entsprechenden Histogramm kaum mehr eine Unterscheidung zwischen der evozierten Antwort und der bei Bin 140 gefundenen ' Pseudoantwort ' möglich (Verhältnis AN(echt) zu AN(pseudo) = 111/95.).

Die hier vorgestellte Auswertung kann und soll nicht die direkte Auswertung durch den Experimentator ersetzen, kann diese aber doch erleichtern. Solange keine Ergebnisse ' erfunden ' werden und der errechnete Zahlenwert einen direkten Bezug zu der 'subjektive' Auswertung hat, kann dadurch die Routineauswertung grosser Datenmengen unter

Umständen wesentlich beschleunigt werden. Als zusätzlicher Vorteil ist die Objektivierbarkeit der gewonnenen Resultate zu werten. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der Resultate verschiedener Experimente, ohne von den Zufälligkeiten der subjektiven Auswertung abhängig zu sein.

Reihe	AN1	AN2	AN3	AN4	AN5
1	23.6	21.8	103.4	68.5	83.5
2	54.8	75.5	44.1	49.8	29.5
3	78.8	64.9	51.5	6.1	43.2
4	8.8	19.5	61.0	32.8	38.6
5	31.9	23.2	19.1	117.8	113.3
6	18.6	36.7	16.1	139.1	69.1
7	13.2	115.1	27.4	18.7	64.3
8	8.9	37.1	63.2	94.8	41.8
9	27.9	35.7	13.5	74.9	22.7
10	50.6	18.1	57.4	37.2	55.6
11	35.3	33.0	21.6	52.1	23.7
12	66.4	144.9	182.4	81.3	73.0
13	30.3	32.2	69.8	89.1	59.8

Tabelle 1 Die Tabelle gibt die für die Histogramme in Bild 13 errechneten "Testantworten" wieder. Die 5 Intervalle, in denen diese Antworten berechnet wurden, sind in der untersten Spur von 13 eingezeichnet (AN1 bis AN5).

3.1.2. Wirkung der elektrischen Stimulierung

Die in Punkt 2.2.3. angesprochene elektrische Reizung der intralaminären Kerne des medialen Thalamus (NIL) bzw der Formation reticularis (MRF) zeigte relativ einheitliche Ergebnisse. Im allgemeinen wird die Spontanaktivität durch el. Reize ohne begleitenden Lichtreiz nicht unmittelbar verändert. Eine Ausnahme wurde bereits in Bild 13 gezeigt. Aber auch in diesem Fall wird die spezifische Antwort durch den elektrischen Reiz verstärkt, obwohl dies dadurch maskiert wird, dass auch der el. Reiz alleine eine transiente Erhöhung der Aktivität nach sich zieht. Dass die Kombination von el. und Lichtreiz bei richtiger zeitlicher Lage (siehe unten) eine qualitativ andere Wirkung hat als jeder Reiz für sich, zeigen die Ca -Messungen: Während die Spikeantwort auf den el. Reiz allein durchaus in der Grössenordung der Antwort auf den Lichtreiz liegt, (siehe Tabelle in Bild 13), zeigt sich nur bei bei der Kombination Lichtreiz + el. Reiz ein deutlicher Ca Abfall. Beim el. Reiz alleine efolgt keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollmessung (Bild 14B, Reihe 2 und 3 für el. Reiz alleine, Reihe 1 als Kontrolle, Reihe 4 für el. + Lichtreiz).

Die el. Reize facilitieren bei richtiger zeitlicher Lage die evozierte Antwort der visuellen Neurone. Beispiele für diese Facilitierung sind in den Bildern 12 und 13 im Histogramm und der numerischen Auswertung sichtbar. In einigen Fällen wurde ein längeranhaltender fazilitierender Effekt festgestellt, durch den auch die zweite Antwort des Neurons (auf den einige Sekunden später in der Gegenrichtung über das RF des Neurons laufenden Lichtreiz) verstärkt wurde (siehe Spalte 6 in der Auswertung zu Bild 12 und die dazugehörigen Histogramme).

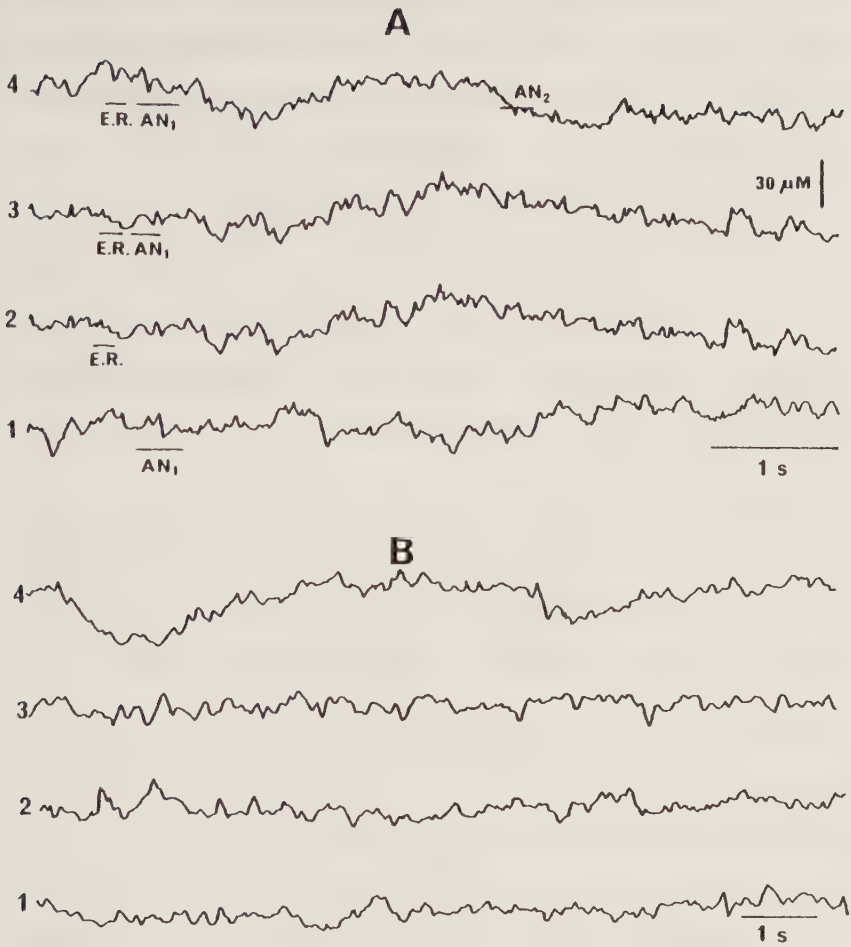


Bild 14 A Ca-Signale einer Zelle als Antwort auf einen Lichtreiz (Reihe 1), auf einen el. Reiz alleine (Reihe 2) und auf eine Kombination aus beiden (Reihen 3 und 4). E.R. markiert den el. Reiz, AN_1 die Antwort des Neuronsauf den in der einen Richtung laufenden Lichtreiz. AN_2 markiert die Antwort auf den zurücklaufenden Lichtreiz.

B Ca-Signale der Zelle aus Bild 13. Reihe 1 Kontrolle (ohne Reize), Reihe 2 und 3 jeweils nur el. Reiz (MRF bzw NIL), Reihe 4 Licht +MRF. Man beachte, dass hier die im Histogramm kaum sichtbare zweite Antwort einen deutlichen Ca-Abfall hervorruft (Reihe 4).

Es wurde bereits erwähnt, dass die Kombination von el. und optischem Stimulus, zumindest teilweise unabhängig von der tatsächlichen Aktivität des Neurons, eine messbare transiente Erniedrigung des extrazellulären Ca -Spiegels hervorrufen kann. Dieses Ergebnis wird in Bild 14A und 14B nochmals dargestellt.Hier wurden die Ca -Antworten einer Zelle (Zelle 6 von Versuch 8) über längere Zeit (etwa 3 h) verfolgt. Wie die ersten beiden Messreihen zeigen, ergibt sich weder bei Licht noch bei el. Reiz alleine eine sichtbare Ca - Antwort. Auch eine (fazilitierende) Kombination der beiden Stimuli (Reihe 3) ruft zu Beginn des Versuchs noch keinen signifikanten Abfall der Ca - Konz. hervor.

In Reihe 4 wird die nach etwa 15-min wiederholter Aktivierung der Zelle mit Lichtreiz + el. Reiz stark verbesserte Ca - Antwort sichtbar. Zugleich zeigt sich zum ersten Mal ein leichter Abfall der Ca -Konzentration nach der Rückantwort (siehe Markierung AN2 in 14A).

Ein ähnliches Resultat ist in Bild 14B für eine anderer Zelle gezeigt. Während die el. Reize alleine (nur NIL in Reihe 2, nur MRF in Reihe 3) keinen Unterschied zur Kontrollmessung (Reihe 1, ohne Reize) zeigen, ergibt die Kombination von Licht + el. Reiz (Reihe 5, Licht + MRF) einen deutlich ausgeprägten Ca -Abfall. Bild 13 zeigt die zu diesen Ca - Spuren gehörigen Antworthistogramme.

Die Kombination eines aktivierenden visuellen Stimulus mit einem fazilitierenden elektrischen Reiz zeigt also Wirkungen, die nicht aus der linearen Addition der beiden Einzeleinflüsse erklärt werden können. Diese Wirkung bezieht sich primär auf das Auftreten von transienten Erniedrigungen der extrazellulären Ca -Konzentration, können aber von qualitativen und/oder quantitativen Veränderungen der neuronalen Antworteigenschaften begleitet werden. Im folgenden Punkt sollen die

Eigenschaften der Ca -Antworten und der sie hervorrufenden und begleitenden Umstände näher gezeigt werden. Dazu werden die Ca -Signale von insgesamt 5 untersuchten Zellen aus 4 Versuchen als typische Beispiele ausgewählt.

3.2. Neuronale Aktivität und extrazelluläres Kalzium

Die hier gezeigten Ergebnisse wurden mit 5 verschiedenen ISMs aufgenommen. Da diese Elektroden fast identische Kennlinien hatten und keine von ihnen ihre Eigenschaften während des Versuchs stark verändert hatte, wie durch das Testen nach der Messung festgestellt wurde, werden die Bedingungen der einzelnen Ableitungen nicht im Detail erläutert. Die Eichmarken in den Abbildungen geben die Absolutwerte der änderung der Ca -Konzentration an, ausgehend von einem Wert von 1.4 mM. Die Kurven entsprechen dem Ca -Signal, also der Spannung (A-B) in Bild 6, die entweder direkt während des Versuchs vom Computer digitalisiert und aufgenommen oder auf Magnetband zwischengespeichert und nachträglich ausgewertet wurden. Dazu wurden in der Regel Messintervalle von 10 oder 20 Sek. in 1000 Messpunkten diskretisiert, wobei meistens über 5 oder 10 Durchgänge summiert wurde. Zur Darstellung wurden die Daten mit dem Auswerteprogramm vergrössert oder verkleinert, geglättet (Zweipunkt - Glättung, zwischen 2 und 4 mal angewandt) und durch eine Hardcopy - Einrichtung ausgegeben.

Bild 15 zeigt 4 Ca -Signale bei Durchgängen zu Beginn der Untersuchung einer neu gefundenen Zelle, wobei als Stimulus nur ein entsprechend optimierter Lichtbalken diente. Die (durch die Auswertung der dazugehörigen Histogramme bestimmte) Antwort des Neurons ist jeweils durch einen Balken markiert. Es ist hier in keinem Fall ein systematischer Abfall der Ca - Konzentration in der Zeit nach der Antwort zu sehen. Es sollte aber erwähnt werden, dass es durchaus einige Zellen gab, die bereits zu Beginn der Ableitung Ca -Signale zeigten. In allen Fällen handelte es sich dabei aber um solche Neurone, deren RF praktisch

identisch war zu der Zelle, die unmittelbar vorher untersucht worden war. Dieser Zelle war also bereits vorher durch für sie ebenfalls annähernd optimale Kombinationen aus visuellen und elektrischen Reizen aktiviert worden, ihre Antwort kann also nicht als Kontrollantwort eines unkonditionierten Neurons bezeichnet werden. Solche Resultate wurden nicht in die Auswertung zu diesem Punkt aufgenommen.

In Bild 16 sind einige Kontrollmessungen gezeigt, bei denen nur elektrische Stimuli appliziert wurden. Auch hier sind keinerlei systematische Antworten zu erkennen. Die elektrische Reizung alleine hatte bei keiner der untersuchten Zellen irgendeine systematische Auswirkung auf das Ca -Signal, auch nicht, wie oben bereits gezeigt (Bild 14B) in Fällen, in denen die Aktivität des Neurons von den el. Reizen beeinflusst wurde. Die hier gezeigten Messungen wurden zu verschiedenen Phasen der Konditionierung gemacht, so die Reihe 1 und 2 zu Beginn, die Reihe 4 zu Ende der Untersuchung, also zu einem Zeitpunkt, zu dem auch Lichtreize alleine bereits Ca -Abfälle evozierten.

Die in Bild 17A gezeigten Resultate wurden ebenso wie die in 17B während eines Durchgangs mit einer fazilitierenden Kombination von visuellen und el. Stimuli gewonnen. Zwischen den Messungen in 17A und 17B liegt ein Zeitraum von etwa 10 bis 30 Min., in dem das Neuron repetitiv durch diese Kombination aktiviert wurde. Es zeigt sich, dass nach dieser Konditionierungsphase die Ca - Antwort, anfangs nur wenig ausgeprägt , dann eindeutig und stabil vorhanden ist. Bild 17C zeigt den Einfluss der zeitlichen Plazierung der el. Reize auf die Ca -Antwort. Bei einer Abstand von 850 ms zwischen dem Ende des el. Reizes und dem Beginn der

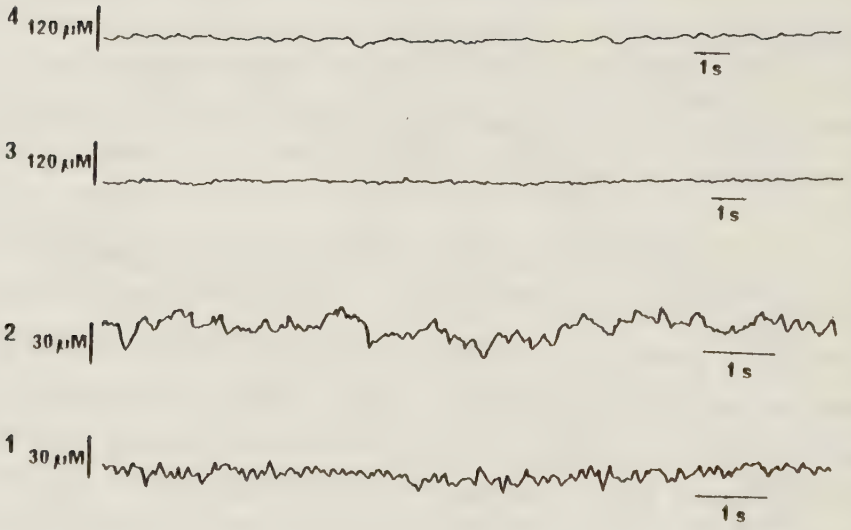


Bild 15 Kontrollmessungen zu Beginn der Konditionierungsphase. Stimulus nur Licht. Ergebnisse von 4 verschiedenen Zellen. Man beachte die verschieden grossen Verstärkungen und Zeiteinheiten.

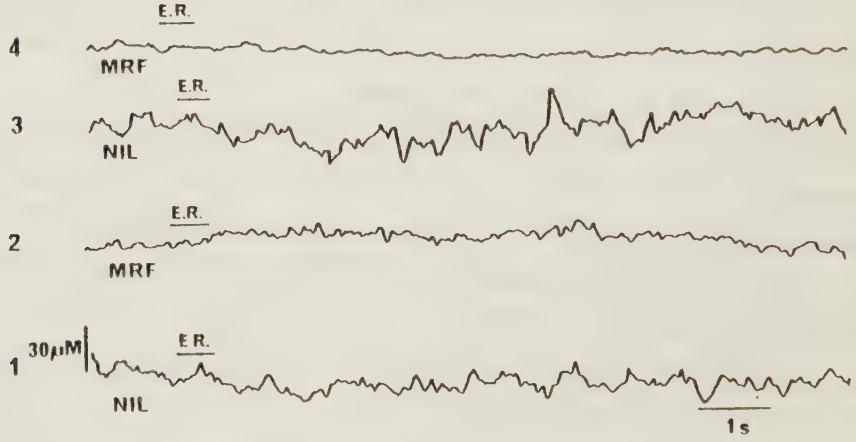


Bild 16 Kontrollmessung zu Beginn der Konditionierungsphase. Stimulus nur el. Reize. E.R. gibt die Plazierung des el. Reizes an.

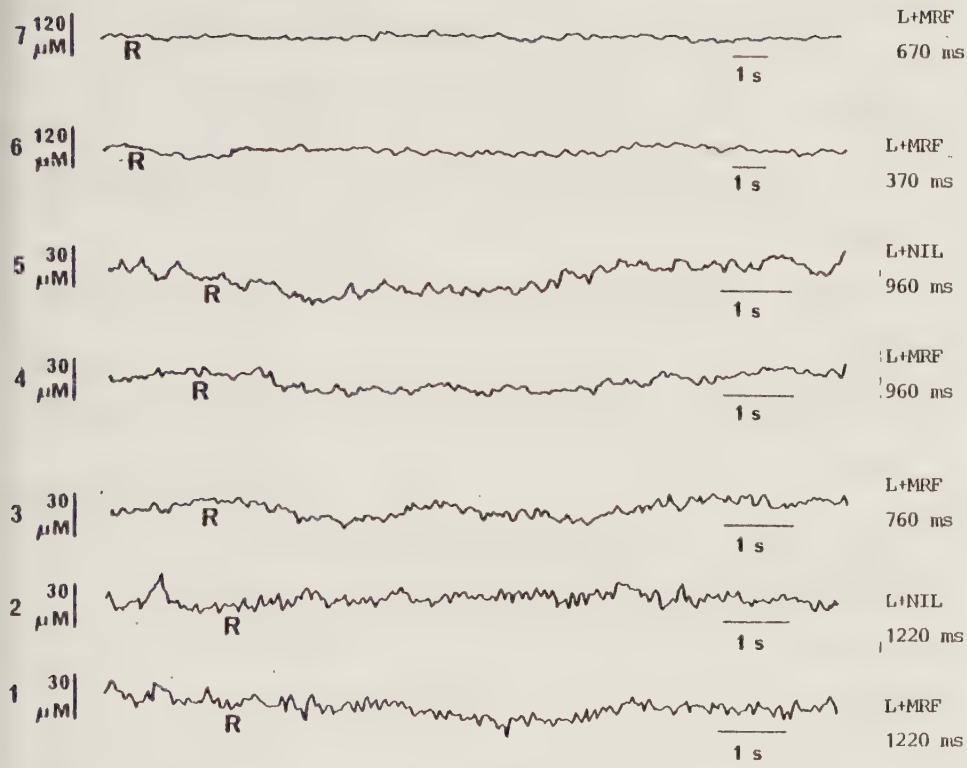


Bild 17 A Ca-Signale zu Beginn der Konditionierungsphase. Stimulusparameter sind rechts neben den Kurven angegeben. Dabei ist L Lichtreiz, MRF und NIL el. Reizung der entsprechenden Areale. Die angegebenen Zeiten bezeichnen die Zeit zwischen dem Beginn der Messung und dem Beginn der el. Reizung. Die Reihen 1 und 2 sowie 3, 4 und 5 und 6 und 7 gehören zu jeweils demselben Versuch. Der Beginn der Antwort (aus dem dazugehörigen Antworthistogramm bestimmt) ist durch R markiert.

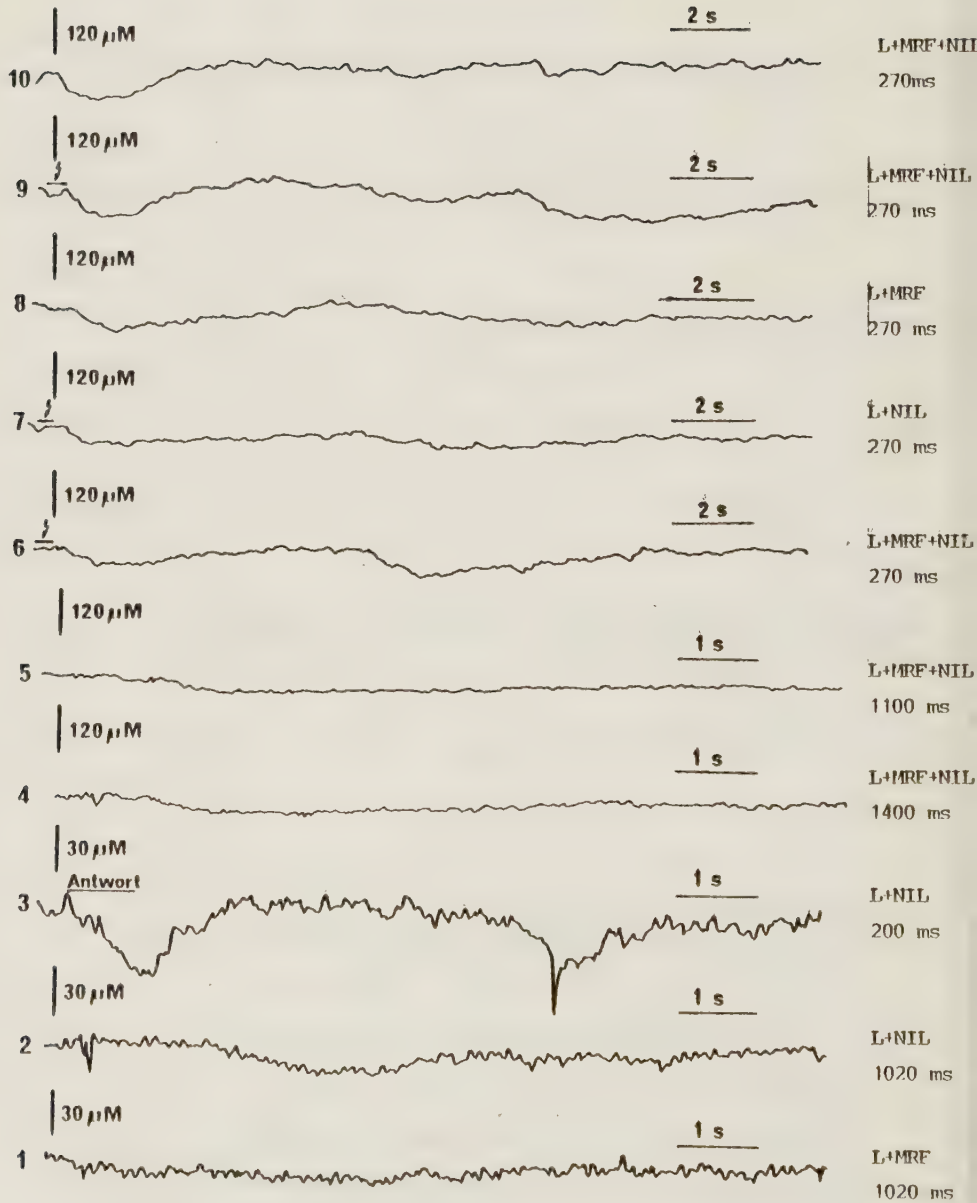


Bild 17 B Ca-Signale gegen Ende der Konditionierungsphase. Stimulus jeweils Licht + el. Reiz. Jeweils die Reihen 1,2, sowie 3, Reihe 4,5 und 6 bis 10 sind Ergebnisse einer einzelnen Zelle. Reizparameter rechts daneben.

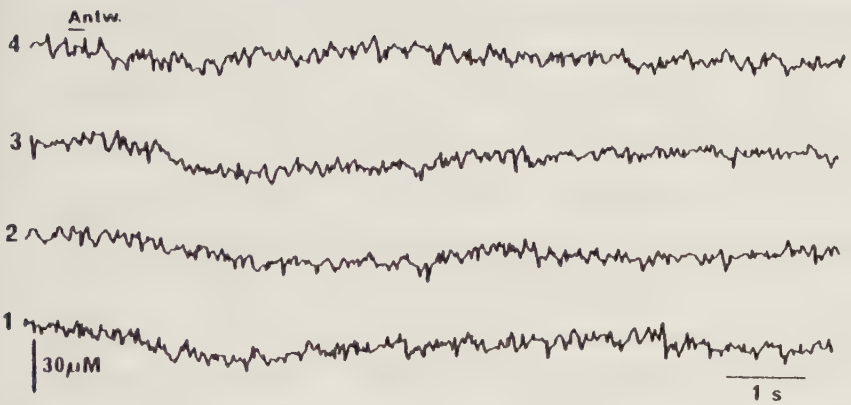


Bild 17 C Einfluss der zeitlichen Plazierung der el. Reize auf die Ca-Antworten.Alle Reihen sind Einzelmessungen einer Zelle. Reihe 1 Licht +MRF, 1100 ms, Reihe 2 Licht+NIL 1100 ms, Reihe 3 Licht +MRF+NIL 900 ms, Reihe 4 Licht+MRF+NIL 400 ms.

evozierten Antwort (Reihe 4) ergibt sich nur eine sehr kleine Antwort, während sie bei 350 ms Abstand (Reihe 3) wesentlich grösser ist. Bei 150 ms Abstand zeigt sich die Antwort am deutlichsten (Reihen 1 und 2).

In einigen Fällen ergibt ein Lichtreiz alleine auch dann noch keine Ca -Antwort, wenn die Kombination Licht + el. bereits starke Ca -Abfälle zur Folge hat (siehe Bild 18A). Meistens aber lässt sich nach einer Konditionierungsphase von 40 Minuten bis zu 2 Stunden auch durch einen unfazilitierten Lichtreiz ein Abfall des Ca -Signals erzeugen, wie in 18B zu sehen ist. Dies wurde in vielen Fällen von einer deutlichen Verbesserung der Antwortcharakteristik begleitet . Neben der Antwortgüte änderten sich in manchen Fällen auch noch andere charakteristische Eigenschaften der untersuchten Neurone. Solche Veränderungen konnten aufgrund der gewählten Methoden nicht systematisch untersucht werden (siehe Diskussion). Ein Beispiel für eine zweifelsfrei festgestellte Modifikation neuronaler Antworteigenschaften ist in Bild 19 gezeigt. Bei diesem Versuch wurde die Tuningkurve, also die Antwort in Abhängigkeit von der Orientierung des als visueller Stimulus verwendeten Lichtbalkens, sowohl zu Beginn als auch am Ende der Konditionierungsphase genau erfasst. Für die Konditionierung wurde hier nicht wie sonst üblich die optimale Orientierung sondern ein um 180 Grad dazu verdrehter Lichtbalken verwendet. Dies war deshalb möglich, weil das Neuron wenig Spezifität zeigte und auch auf den nicht optimalen Reiz gut reagierte (ersichtlich aus den Tuningkurven in Bild 19). Nach einer etwa 45-min. Konditionierung mit dem "falschen" Reiz wurde die Tuningkurve nochmals ermittelt (Kurve 2 in Bild 19). Es stellte sich heraus, dass sich jetzt das Maximum der Kurve bei der Orientierung des konditionierenden Stimulus befand. In diesem Fall wurde also die Antwortcharakteristik eines Neurons drastisch verändert unter Bedingungen, die gleichzeitig das Auftreten von Ca -Signalen ermöglichen.

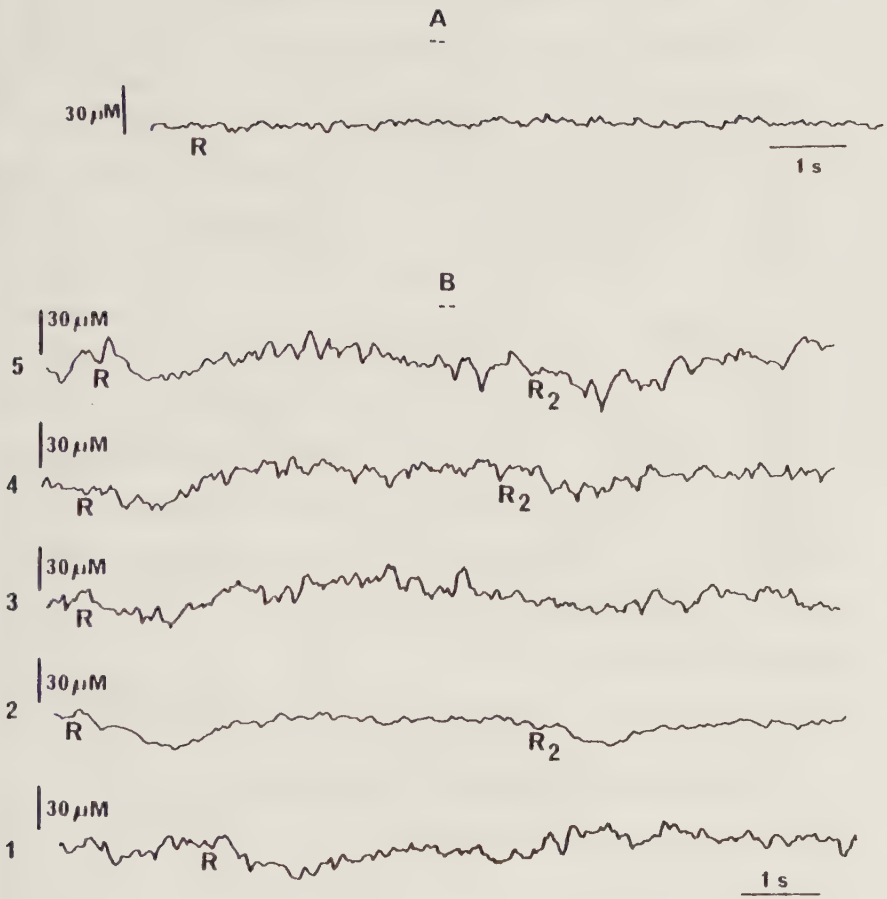


Bild 18 A Diese Zelle zeigte auch nach einer etwa 30 min Konditionierung keinen Abfall der Ca-Konz. als Antwort auf Stimulierung durch den Lichtreiz alleine.

B Ca-Antworten von 5 verscheidenen Zellen auf Lichtreiz alleine. Der Zeitpunkt des Lichtreizes ist durch R markiert. R_2 ist der Zeitpunkt, an dem der Lichtbalken, der als Reiz verwendet wurde, in der Gegenrichtung über das rezeptive Feld des Neurons passierte.

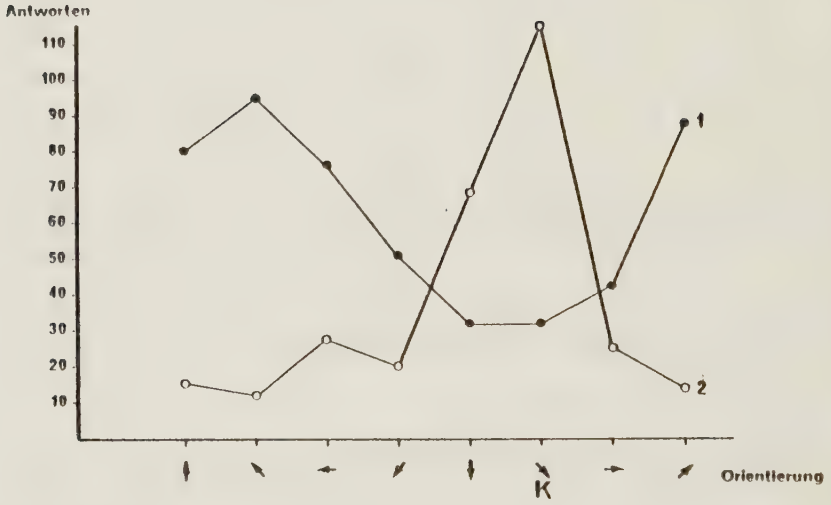


Bild 19 Tuningkurve eines Neurons vor (Kurve 1) und nach (Kurve 2) einer längeren Konditionierungsphase. Die Orientierung des konditionierenden Stimulus ist durchein K markiert.

Wie in Bild 11B gezeigt und bereits in Punkt 2. erklärt, wurde neben den Ca - Signalen auch das Feldpotential Fp, also das Ausgangssignal der Referenzelektrode mit aufgenommen. Bild 20 zeigt 2 verschiedene Ca - Signale zusammen mit den Antworthistogrammen und (in der obersten Reihe) den zugehörigen Feldpotentialen. Diese Fps traten in charakteristischer Weise oft in solchen Fällen auf, in denen die Antwort des betrachteten Neurons auch ohne el. Reizung sehr stark ausgeprägt war. Charakteristisch waren die Fps insofern, als sie immer kürzer als die gleichzeitig gemessenen Ca - Antworten waren, mit kürzerer Latenz erfolgten und immer negativ waren. Dies ist etwas überraschend, da bei extrazellulären Messungen ein von der Lage der Elektrode relativ zu den Neuronen abhängiger Spannungsverlauf mit mono- di- oder triphasischen Anteilen verschiedener Polarität zu erwarten wäre. Es wurden aber in keinem Fall Fps festgestellt, die positive Komponenten aufgewiesen hätten. Die Ursache dieser Fp - Antworten ebenso wie ihr etwaiger Zusammenhang mit Ca - Leitfähigkeiten ist noch ungeklärt.

Der relativ grosse Durchmesser der verwendeten Mikroelektroden (siehe Punkt 2.) hatte zur Folge, dass intrazelluläre Messungen nur in sehr wenigen Fällen gelangen. Nach dem anfänglichen sehr starken Abfall des Signals nach Eindringen in die Zelle wurden in diesen Fällen bei entsprechender Reizkonfiguration (identisch zu den oben besprochenen) transiente Ca - Erhöhungen gemessen, die von ihrer Kinetik her schneller waren als die analogen extrazellulären Antworten. Da über die Empfindlichkeit der ISMs bei so niedrigen Konzentrationen (kleiner als 10 uM) keine genauen Daten existierten, können allerdings keine Aussagen über die Grösse dieses Ca - Einstroms gemacht werden. Das Auftreten solcher Signale ist allerdings ein weiterer deutlicher Hinweis darauf, dass die

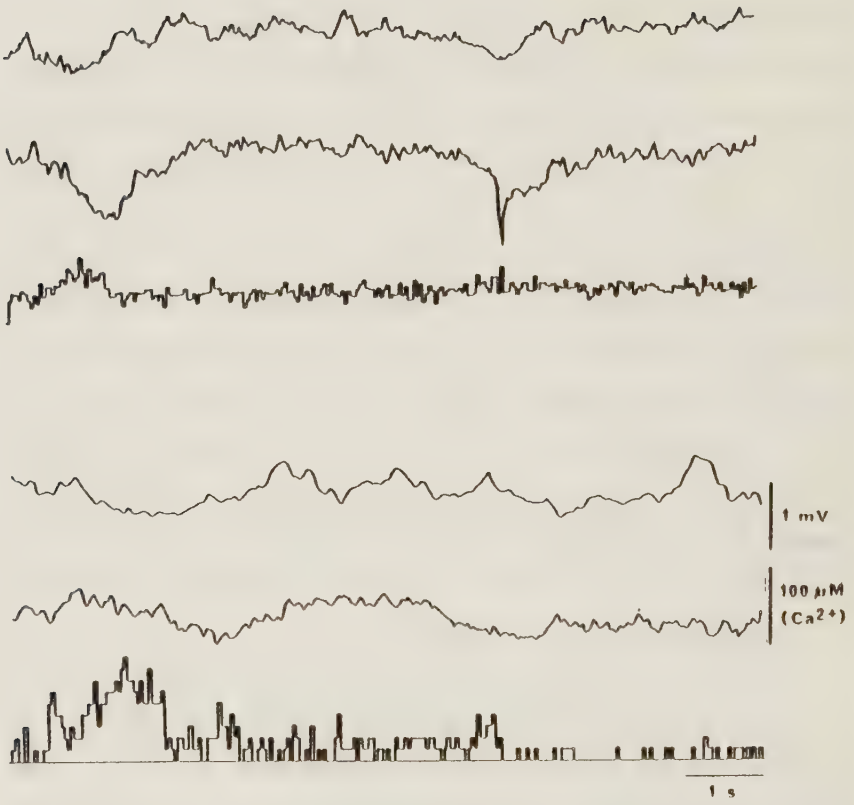


Bild 20 Feldpotentiale. Die unterste Reihe zeigt jeweils das Antworthistogramm des Neurons nach Reizung mit einem optimalen visuellen Stimulus zusammen mit einem fazilitierenden el. Reiz. Die Reihe darüber zeit das dabei gemessene Ca-Signal, in dem ein deutlicher Abfall der gemessenen Ca-Konzentration zu sehen ist. In der dritten Spur ist das gemessene Feldpotential zu sehen, also das DC-Potential der Referenzelektrode. Hier kann ein deutlicher Abfall der Spannung gesehen werden der bereits während der evozierten Antwort auftritt und zu Ende ist, vor das Ca-Signal seine Grundlinie wieder erreicht. Derselbe Effekt ist zum Zeitpunkt der zweiten evozierten Antwort zu erkennen, die nur durch eine Lichtreiz alleine ausgelöst wurde. Es handelt sich also weder um einen el. Artefakt noch um ein mit der Ca-Elektrode zusammenhängendes Ereignis. Die oberen drei Spuren demonstrieren ein sehr ähn-

untersuchten Ca-Kanäle tatsächlich postsynaptischen Ursprungs sind (siehe Diskussion).

Da bei den erwachsenen Katzen in keinem Fall das Auftreten von Ca - Antworten beobachtet wurde, soll hier nur ein Beispiel gezeigt werden. In Bild 21 ist in der obersten Reihe das während des Versuchs gemessene Fp gezeigt, die mittlere Reihe gibt das Ca - Signal, die unterste das dazugehörige Antworthistogramm an. Diese Daten, Mittelwerte aus 10 Durchgängen, wurden aufgenommen, nachdem das Neuron etwa 70 Minuten lang mit einer Kombination aus facilitierendem MRF - Reiz und dem passenden optischen Stimulus konditioniert worden war. Wie das Histogramm zeigt, ist die Antwort des Neurons deutlich ausgeprägt (zweite Antwort beim Zurücklaufen des Lichtbalkens über das rezeptive Feld), das Feldpotential zeigt die für starke Antworten typische Negativität, aber das Ca - Signal bleibt unverändert konstant.

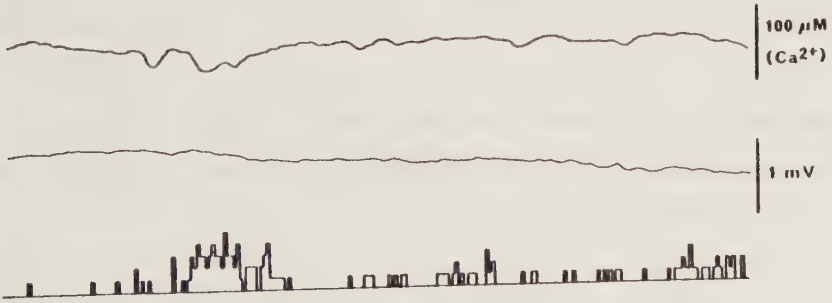


Bild 21 Versuchsergebnis einer erwachsenen Katze. Bezeichnung wie in 20.

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Es gibt offensichtlich im visuellen Cortex junger Katzen Ca -Leitfähigkeiten, die nicht ein Bestandteil normaler neuronaler Aktivität sind. Die auftretenden Ca - Signale sind zumindest teilweise unabhängig von den postsynaptischen Aktionspotentialen, wenn sie auch niemals in Abwesenheit postsynaptischer AKtivität auftreten. Dies weist stark darauf hin, dass es sich nicht um verstärkte oder unter besonderen Umständen sichtbar werdende präsynaptische Ca -Ströme handelt. Dazu passt auch der Befund, dass die Aktivierung eines (mehr oder weniger) unspezifischen modulierenden Systems notwendige Voraussetzung fÜr das erstmalige Auftreten von Ca - Antworten ist.

Würde es sich tatsächlich um das Einströmen von Ca in die präsynaptischen Terminalen handeln, müsste dann auch der modulierende Einfluss von MRF oder NIL auf dieser Seite angenommen werden, der dann den Ca - Einstrom um Grössenordnungen verstärken würde (siehe Abschätzung der Amplituden der Ca - Senken in 3.4.5), ohne dass sich die postsynaptische Aktivität in ähnlichem Mass verändert. Da aber der Ca - Einstrom allen bisherigen Annahmen nach eine verstärkte Transmitterausschüttung zur Folge hat, ist dies sehr unwahrscheinlich.

Man kann also den Schluss ziehen, dass es sich um Ca - Kanäle der postsynaptischen Membran handelt. Diese Kanäle haben offensichtlich andere Schwelleneigenschaften als die normalerweise auftretenden Ionenleitfähigkeiten. Für das erstmalige Überschreiten der Ca - Auslöseschwelle ist offensichtlich eine mehrfache Aktivierung des Neurons durch einen spezifischen Lichtreiz gepaart mit einem unspezifischen el. Stimulus notwendig. Der Einfluss der el. Stimuli bestehte dabei nicht darin, die Antwort des Neurons zu verstärken und sekundär die Ca -Kanäle

zu aktivieren. Wäre nämlich nur die Anzahl der Aktionspotentiale pro Zeiteinheit ausschlaggebend für das Einschalten der Ca - Kanäle, würde auch jede transiente Veränderung der Spontanaktivität darauf Einfluss nehmen. Bild 13 zeigt in Reihe 2 und 3 eine Erhöhung der Aktivität, die aber, wie in Bild 14C zu sehen ist, keinerlei Ca - Abfall nach sich zieht. Dieses Fehlen von Ca - Antworten hier wie auch in den Fällen, in denen die Aktivität des Neurons von el. Reizen alleine völlig unbeeinflusst bleibt, zeigt eindeutig, dass nur eine Kombination aus el. und visuellen Reizen Ca - Kanäle erstmalig aktivieren kann. Sind die Kanäle aber aktiv geworden, so lassen sich in der Regel im weiteren Verlauf der Konditionierung mit Lichtreizen alleine Ca - Abfälle evozieren. Die Schwelle der Ca - Kanäle wird also nicht nur durch die kombinierte Reizung erreicht, sondern es werden auch Eigenschaften des Systems verändert, die diese Schwelle über längere Zeit hin so absenken, dass eine spezifische Aktivierung des Neurons sie überschreiten kann. Es muss eine spezifische Aktivierung sein, da auch in dieser Phase Veränderungen der Spontanaktivität bzw. Applikation el. Reize alleine keinerlei Wirkung hervorruften (vergl. Bild 16).

3.4. Diffusionsvorgänge

Die Relevanz der gemessenen Ca - Ströme für physiologische Prozesse kann nur dann beurteilt werden, wenn die entsprechenden Ionenverschiebungen nach Grösse und örtlicher Verteilung hinreichend genau bekannt sind. Die beste Möglichkeit dazu bietet die rechnerische Behandlung der experimentell festgestellten Diffusionsvorgänge unter Berücksichtigung einer problemangepassten Modellvorstellung.

3.4.1. Physikalisches Modell

Für die rechnerische Behandlung mikroskopischer Diffusionsvorgänge müssen, worauf beispielsweise Nicholson und Phillips (1980) hinwiesen, die Randbedingungen je nach der geometrischen Grössenordnung des behandelten Problems verschieden ausgewählt werden. Für Diffusionsstrecken, die gross gegenüber der Feinstruktur des neuronalen Gewebes sind, kann dieses Gewebe als isotrop angenommen und die freie dreidimensionale Diffusion als Modell gewählt werden (beispielsweise Gardner-Medwin und Phillips 1981, Gardner-Medwin 1982). Die Struktur des Gewebes wird dabei durch Korrekturfaktoren berücksichtigt, die den Anteil des freien Volumens am Gesamtinhalt durch die Volumenfraktion alpha und die Verlängerung der tatsächlichen Diffusionsstrecke gegenüber dem geometrischen Abstand durch die Tortuosität lamda korrigieren (siehe auch die Diskussion). Bei Diffusionsvorgängen auf mikroskopischem Niveau ist dies jedoch eine unzulässig starke Vereinfachung, die in solchen Fällen auch nicht zum Ziel führt (siehe Punkt 4.1.). Für die Wahl der hier notwendigen Randbedingungen muss ein anderes Modell entwickelt werden. als Richtlinien dafür können neuroanatomische, speziell elektronenmikroskopische Daten verwendet werden.

Für ein solches Modell geht man von einem Konglomerat aus Einzelzellen aus, die durch sehr kleine Zwischenräume getrennt sind. Für sehr kleine Dimensionen kann als vereinfachte Vorstellung eine zweidimensionale Flüssigkeitsschicht verwendeten werden, die in der dritten Dimension durch die Membranen zweier Zellkörper begrenzt wird (Bild 22). Für etwas grössere Abstände, die nicht mehr vernachlässigbar gegen die Ausdehnung der Zellen selbst sind, ergeben sich Verzweigungen und Erweiterungen dieser Schicht, die aber im wesentlichen immer noch als zweidimensional angenommen werden kann. Man kann allerdings dann nicht mehr von einem von der dritten Koordinate unabhängigen Diffusionsvorgang sprechen. Dieses Problem kann aber durch geeignete Wahl der Randbedingungen umgangen werden (siehe Punkt 4.).

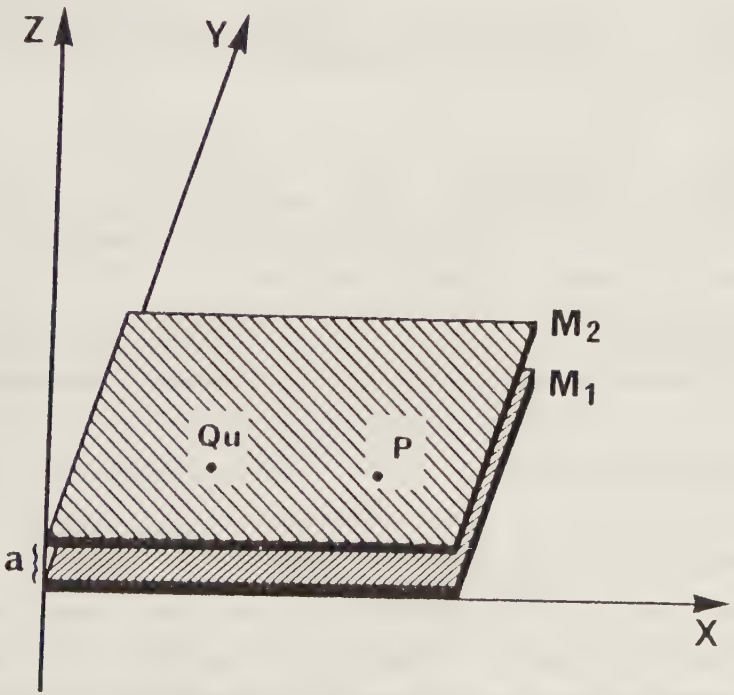


Bild 22 Physikalisches Modell zur Diffusion. M_1 und M_2 sind die Membranen der die Flüssigkeitsschicht begrenzenden Zellen, Qu und P die Position der Quelle bzw. Der Ableitelektrode. Der Abstand a zwischen den Membranen M_1 und M_2 in Z-Richtung ist klein genen die sonstigen Abstände, insbesondere den Abstand zwischen P und Qu.

3.4.2. Mathematische Behandlung der Diffusion

Die oben angegebene Modellvorstellung der Diffusionsverhältnisse im Extrazellulärraum kann in ein mathematisches Modell umgesetzt werden, dessen Lösung einige Aussagen über die Zeitabhängigkeit der Diffusion von Ca - Ionen erlaubt. Ein Vergleich dieser Aussagen mit entsprechenden experimentellen Ergebnissen lässt Rückschlüsse auf die Gültigkeit der angewandten Modellvorstellung und damit auf die tatsächliche Struktur des EZR, die Verteilung der Ca - Quellen bzw. - Senken und deren Grössenordung zu. Zu Beginn sollen aber die Grundlagen des weiteren Vorgehens behandelt werden.

Diffusionsvorgänge werden durch die partielle Differentialgleichung

$$\Delta u(\vec{R},t) = \frac{1}{k} \frac{\partial u(\vec{R},t)}{\partial t} \qquad (1)$$

beschrieben. Die mathematischen und physikalischen Grundlagen dazu können einschlägigen Lehrbüchern entnommen werden (beispielsweise Sommerfeld, Band IV, Partielle Differentialgleichungen der Physik). Lösungen einer solchen Gleichung sind stark von den vorgegebenen Randbedingungen abhängig und nur in Sonderfällen in geschlossener Form darstellbar. Die Abhängigkeit der Lösung von den Randbedingungen macht eine exakte Formulierung dieser Bedingungen bereits vor der Suche nach dem Lösungsansatz notwendig. Für den hier zu behandelnden Fall werden in Übereinstimmung mit den oben gemachten Annahmen folgende Bedingungen gewählt: Es wird ein (zweidimensionales) Rechteck der Kantenlängen XRAND und YRAND betrachtet. Im Inneren dieses Rechtecks befindet sich eine Quelle QU (Koordinaten XQU und YQU), die zum Zeitpunkt t = 0 für

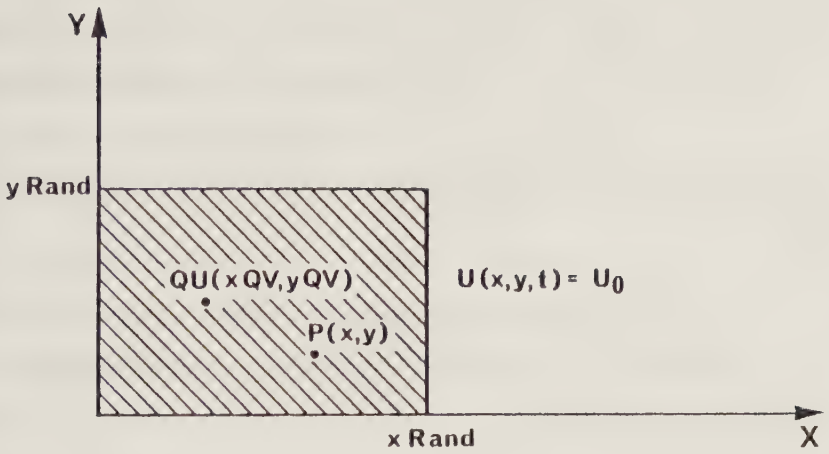


Bild 23 Randbedingungen der zweidim. Diffusionsgelichung. QU(XQU,YQU) ist der Ort der Deltaquelle, P(x,y) ist der Punkt, in dem die Konzentration U(x,y,t) in Abhängigkeit von der Zeit gemessen bzw. berechnet wird. Das betrachtete Rechteck erstreckt sich von 0 bis XRND in der X-Richtung, von 0 bis YRND in der Y-Richtung. Ausserhalb dieses Rechtecks ist die Konzentration für alle Zeiten konstant gleich U_o.

unendlich kurze Zeit mit unendlich grosser Amplitude eingeschaltet wird, wobei der Zeitverlauf so ist, dass das Integral über die Einschaltdauer der Quelle gerade den Werte 1 (in beliebigen Einheiten, Dimension etwa Teilchenzahl oder auch Mol) annimmt (sogenannte Delta - Quelle). Die von diesem Punkt ausgehende Konzentrationsänderung breitet sich innerhalb des Rechtecks aus und wird im Punkt P gemessen (Koordinaten X und Y, siehe Bild 23). Die Randbedingungen an den Grenzen des Rechtecks werden so gewählt, dass die Konzentration ausserhalb für alle Zeiten t konstant bleibt.

Die mir von Professor Dr. R.Röhler freundlicherweise zur Verfügung gestellte Lösung ist als unendliche Reihe von Winkelfunktionen dargestellt (Fouriermethode):

$$U(x,y,t) = \frac{4}{XL*YL} * \sum_{n=1}^{\infty} \sin(\pi*n*\frac{XQ}{XR}) * \sin(\pi*n*\frac{x}{XR}) * \exp(-(\frac{\pi*n}{XR})^2 * kt *$$
$$* \sum_{m=1}^{\infty} \sin(\pi*m*\frac{YQ}{YR}) * \sin(\pi*m*\frac{y}{YR}) * \exp(-(\frac{\pi*m}{YR})^2 * kt$$

(11)

wobei U(x,y,t) die Konzentration an der Stelle (x,y) mit 0<x<XRAND und 0<y<YRAND zum Zeitpunkt t>0 bedeutet, wenn zur Zeit t=0 am Ort (XQU,YQU) eine Deltaquelle eingeschaltet wurde.

Das Verhalten von räumlich oder zeitlich ausgedehnten Quellen kann dadurch berechnet werden, dass über die Einzellösungen für entsprechend verteilte Deltaquellen summiert wird. Beispielsweise wird eine von t=0 bis t=T1 eingeschaltete Quelle dadurch erfasst, dass die Lösungen für N Quellen, die jeweils zur Zeit t=0,dt,2*dt....(N-1)*dt eingeschaltet werden (mit dt=T1/(N-1)), aufsummiert werden, was hier wie bei allen linearen

Differentialgleichungen erlaubt ist. Soll statt einer Erhöhung eine Erniedrigung der Ausgangskonzentration durch das Einschalten der Deltaquelle verursacht werden, wie dies bei den zu behandelnden Ca - Kanälen der Fall ist, kann dies durch einfache Vorzeichenänderung berücksichtigt werden. Physikalisch unsinnige negative Konzentrationen werden durch Addition einer konstanten Ausgangskonzentration vermieden.

Die Berechnung der Lösungen ist numerisch durch einen Digitalrechner relativ einfach möglich. Das Programm DIFFGL.FOR j berechnet den zeitlichen Verlauf von U(x,y,t) an einer vorgegebenen Stelle (x,y), wobei noch die Parameter XRAND und YRAND sowie die zeitliche Schrittweite und die Diffusionskonstante vorgegeben werden müssen. Zur Beschleunigung der Berechnung können die zeitunabhängigen sin - Glieder in (II) einmalig vorab berechnet und für alle folgenden Zeitpunkte wieder verwendet werden. Als Abbbruchkriterium für die Summation wird die Grösse der Exponentialfaktoren verwendet, die beide unterhalb der voreingestellten Genauigkeit liegen müssen. Soll eine zeitlich ausgedehnte Quelle simuliert werden, summiert das Programm auf eine entsprechende Anweisung hin über die zeitverschobene Lösung von t=0 bis t=TEIN, der gewünschten Einschaltdauer. Um negative Konzentrationen zu umgehen, wird zum Ergebniss jeweils die Zahl 1 addiert. Da letzten Endes ein Vergleich mit den experimentell ermittelten Resultaten erfolgen soll, wurden die errrechneten Werte dann auf die logarithmische Kennlinie einer hypothetischen ionensensitiven Elektrode umgerechnet und das Ergebnis so normiert, dass eine Bearbeitung und Darstellung durch das Auswerteprogramm AUSWER analog zu den Versuchsdaten möglich war. Die logarithmische Darstellung hatte noch einige Vorteile: Die a priori unbekannte Diffusionskonstante k verschiebt in dieser Darstellung nur mehr den Abbildungsmasstab auf der Zeitachse. Dies ermöglicht eine Beurteilung der Form der Lösungen und eine Anpassung dieser Form durch Variation anderer

Parameter unabhängig von der tatsächlichen Grösse von k. Anschliessend können dann durch änderung von k die ermittelten Verzögerungen angepasst werden. Auch eine Addition einer von 1 verschiedenen Ausgangskonzentration A würde in dieser Darstellung nur die Addition des konstanten Summanden log(A) und die Division der Werte durch den Faktor A zur Folge haben, was nur einer Skallierung entspricht und ebenfalls keinen Einfluss auf die Kinetik hat. Die Gesamtformel für die auszuwertenden Ergebnisse lautet dann:

$$U_G(x,y,t) = \log(1-U_S(x,y,t))$$

mit $$U_S(x,y,t) = \sum_{i=0}^{\frac{TEIN}{TDELT}} U_E(x,y,t-i*TDELT)$$

wobei $U_E(x,y,t) = U(x,y,t)$ für $t>0$ (aus II)

und $U_E(x,y,t) = 0$ für $t<0$ gilt.

Man kann also davon ausgehen, dass die Kinetik der errechneten Kurven Eigenschaften aufweist, die weder von der Diffusionskonstanten noch von der Amplitude der Quelle sondern ausschliesslich von der Geometrie der Anordnung bestimmt werden. Ein Vergleich solcher Eigenschaften zwischen experimentellen und rechnerischen Ergebnissen sollte also eine Zuordnung dieser geometrischen Parameter ermöglichen, ohne die Diffusionskonstante oder Amplitude berücksichtigen zu müssen. Umgekehrt lässt sich unter Umständen die Diffusionskonstante durch Angleich des zeitlichen Verlaufs zweier hinsichtlich ihrer Kinetik ähnlicher Ergebnisse rekonstruieren (siehe dazu 4.).

Für die Diffusionskonstante wurde zu Beginn ein beliebiger Wert angenommen, da eine Änderung, wie gezeigt, nur eine Dehnung oder Stauchung des Zeitmasstabes ergab. Eine Korrektur dieser Konstante erfolgte erst im Anschluss an die Anpassung der Kinetik, wenn die Verzögerungen der errechneten an die experimentellen Ergebnisse angeglichen wurde.

Die hauptsächlichen Parameter bei der Anpassung waren also neben der unkritischen Grösse des Rechtecks vor allem die relative Lage von Quelle und Ableitpunkt (die Lösungen sind symmetrisch in Bezug auf Vertauschung von QU und P). Durch systematische Variation dieser Werte innerhalb bestimmter Grenzen wurde dann eine Anpassung an die vorgegebenen Ergebnisse versucht. Im nächsten Punkt werden einige typische Beispiele für solche Resultate gezeigt. Dabei wird zugleich der Einfluss der Berücksichtigung zeitlich ausgedehnter Quellen sichtbar gemacht. In der Diskussion wird eine Rechtfertigung für die Wahl der Randbedingungen der Gleichung gegeben.

3.4.3. Einige Beispiele der Modellrechung

Bild 24 zeigt einige Resultate für verschiedene geometrische Annahmen. Die Reihen 1 bis 3 zeigen den Zeitverlauf für kleine, mittlere und grosse Abstände bei einem im Vergleich zu diesen Abständen sehr grossen Rechteck, wobei jeweils die linke Kurve das Verhalten einer einzelnen Deltaquelle zeigt und die rechte Kurve für eine zeitlich ausgedehnte Quelle berechnet wurde. Die Angaben neben den Kurven geben die Amplitude des Minimums (in willkürlichen Einheiten) an, für die Darstellung wurden die Kurven auf gleiche Amplitude normiert.

In den Reihen 4, 5 und 6 ist der Einfluss der Randnähe zu sehen. In Reihe 4 ist der Abstand von Quelle und Ableitpunkt vom Rand am kleinsten, in 6 am grössten, wobei bei allen drei Reihen die relative Lage von QU und P identisch ist. Es sind wieder Einzelquellen links und ausgedehnte Quellen rechts gezeigt. Die Reihe 7 ist jeweils die Differenz aus 4 minus 6, um die Unterschiede der Kinetik besser zu verdeutlichen. Es zeigt sich, dass bei kleineren Abständen vom Rand sowohl Abfall als auch Anstieg schneller sind.

Das Bild 25 zeigt den Einfluss verschiedener Summationszeiten, also eine änderung der zeitlichen Ausdehnung der betrachteten Quelle. In den Reihen 1 bis 6 steigt diese Einschaltzeit um jeweils denselben Betrag. Dadurch wird das Erreichen des Minimums verzögert und die abfallende Phase in charakteristische Weise verändert. Die Kurven links sind dabei für relativ geringe Entfernungen von QU und P berechnet, rechts daneben für eine grössere Distanz bei sonst identischen Parametern. Bei der grösseren Entfernung (50 um bei den rechten Kurven) hat eine Erhöhung der Summationszeit keinen allzugrossen Einfluss auf die Kinetik.

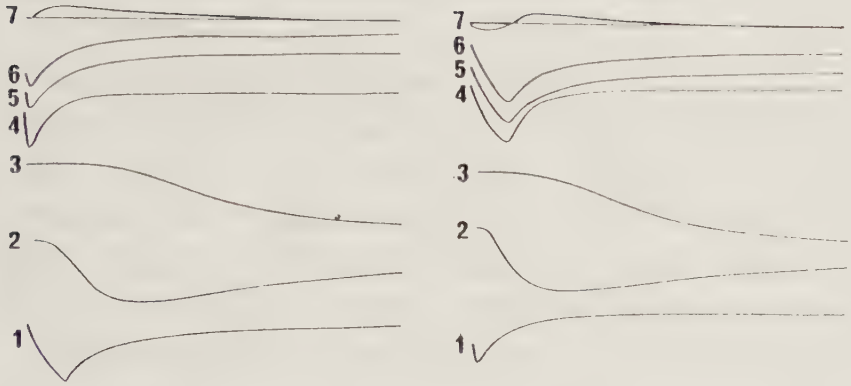


Bild 24 Modellrechnung für Eine Quelle bei QU(750,750) und einer Seitenlänge des Rechtecks von 1500x1500 um. Der Ableitpunkt P liegt für die Reihen 1 bis 3 bei jeweils (600,600), (680,680) und (730,730). In den Reihen 4 bis 6 ist die Distanz zqischen P und QU jeweils gleich bei verscheidenem Abstand vom Rand (Y-Koord. jeweils 230 für QU und 80 für P, Y-Koord. 30, 80 und 230). Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Kinetik ist in Reihe 7 jeweils die Differenz zwischen Reihe 4 und 6 gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Ergebnisse der linken Seite, wo Einzelquellen simuliert wurden, über eine Einschaltdauer von 500 ms summiert gezeigt.

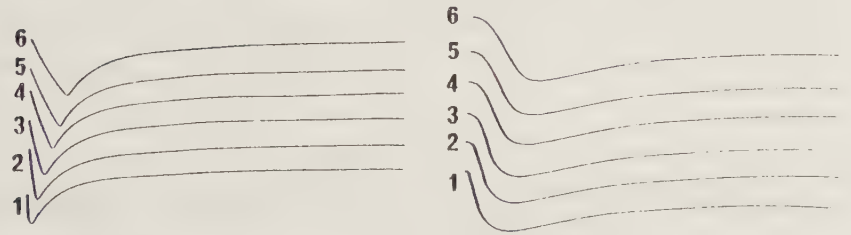


Bild 25 Verschiedene Summationszeiten von 10 ms in Reihe 1 bis 510 ms in Reihe 6. Bei den linken Kurven ist P(230,230) und Qu(250,250), rechts P(200,200) und QU(250,250).

In Bild 26 wurden Ergebnisse mit unterschiedlichen Entfernungen durch gleichzeitige Änderung der Diffusionskonstanten (was ja nur einer Veränderung des Zeitmasstabes bedeutet) aneinander angeglichen, um zu untersuchen, ob dadurch verschiedene geometrische Bedingunen zu den selben Resultaten führen können. Es bestehen aber offensichtlich so deutliche Unterschiede im Verlauf der Kurven, dass sie keinesfalls durch Dehnung oder Stauchung zur Deckung gebracht werden können. Dies ist besonders deutlich bei kürzeren Entfernungen (zwischen 20 und 60 um in den Ergebnissen links in Bild 26), aber auch bei verhältnismässig grossen Entfernungen (140 bis 180 um bei den Kurven rechts) sind noch Unterschiede erkennbar.

Es ergeben sich also bei unterschiedlicher Geometrie Kurven unterschiedlicher Form mit Eigenschaften, die weitgehend unabhängig von der Amplitude und der Diffusionskonstanten sind. Eine Zuordnung einzelner Kurven zu experimentellen Ergebnissen durch Vergleich ihrer Kinetik unabhängig vom Zeitmasstab scheint also durchaus möglich.

Bild 26 Verschiedene Entfernungen, gedehnt auf gleiche Position des Minimums. Qu(200,200), P(x,200) mit x von 230 bis 270 links und von 340 bis 380 rechts.

3.4.4. Anpassung an experimentelle Resultate

Die unterste Reihe von Bild 27 zeigt das Versuchsergebnis, das als Vorlage für eine Approximation durch eine rechnerisch ermittelte Kurve verwendet wurde. Diese Kurve wurde stellvertretend für andere, in ihrer Form ziemlich ähnliche Resultate benutzt, da sie einen relativ ungestörten Verlauf zeigt und die dabei gebrauchte Elektrode unmittelbar nach dieser Ableitung auf die Stabilität ihrer Kennlinie hin untersucht wurde. Ausserdem waren während der Untersuchung dieser Zelle einige Hinweise dafür vorhanden, dass die Position der Elektrode in Bezug auf die Zelle im wesentlichen konstant blieb (Form und Grösse der aufgenommenen Aktionspotentiale, Art der evozierten Potentiale etc.). Dies ist insofern von Bedeutung, als jede Veränderung geometrischer Parameter zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messwertaufnahmen, die ja zur Mittelwertbildung summiert werden (hier beispielsweise 10 Durchgänge) eine Veränderung der Kinetik der Resultate zur Folge hätte. Diese Veränderungen hätten, wie auch Verschlechterungen der Elektrodencharakteristik oder zeitliche Verschiebungen der evozierten Antwort, in jedem Fall eine Verschleifung der Antworten zur Folge, also die Wirkung eines Tiefpassfilters. Deshalb scheint es auch angebracht, von mehreren ähnlichen Ergebnissen dasjenige auszuwählen, das die am stärksten ausgeprägte Antwort zeigt, wie dies hier der Fall ist.

Das über dieser Kurve gezeigte Resultat der Approximation ist die bestmögliche Annäherung, die im wesentlichen durch Trial-and-Error Vorgehen ermittelt wurde. Um nicht allzuviel Zeit darauf verwenden zu müssen, diese beste Approximation zu finden, wurde mit der Suche in einem einigermassen vernünftig scheinenden Bereich begonnen. Dazu wurden zurst die Dimensionen der zu erwartenden Lösung abgeschätzt. Die Summationszeit TEIN, also die Einschaltdauer der Ca - Kanäle, konnte direkt aus den

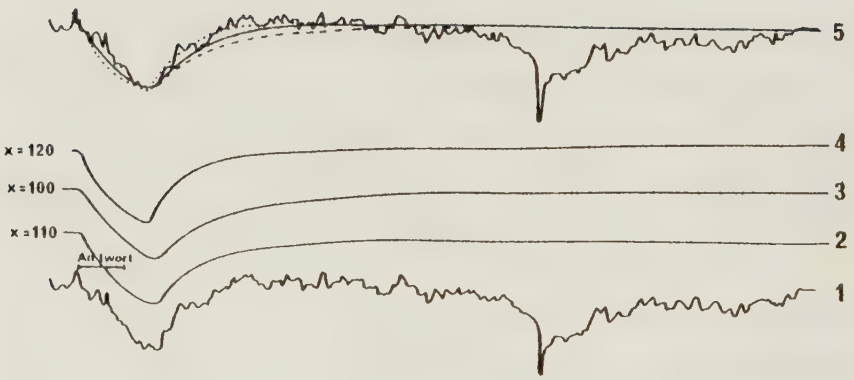


Bild 27 Anpassung rechnerischer Lösungen an ein experimentelles Resultat. Bedingungen: Rechteck 300 x 300 um, Quelle bei (150,150), Ableitpunkt P(x,50) mit x=100 bis x=120. Summationszeit 500 ms, Diffusionskonstante 2000 (um^2/s).

Versuchsergebnissen übernommen werden. Bei einer Wahl der Längeneinheit als Mikrometer sowie der Zeiteinheit Sekunde ergaben bereits die ersten Resultate, dass eine der vorliegenden Kurve ähnliche Kinetik nur für einen relativ engen Bereich der Positionen von QU und P zu erzielen war. Wie die Reihen 2 und 3 in Bild 27 zeigen, ergab bereits eine Verringerung oder Vergrösserung des Abstanden um 10 um eine deutliche Verschlechterung der Anpassung, ebenso wie eine Veränderung der Entfernung zum Rand. In der obersten Kurve sind die vier unteren Ergebnisse übereinander gezeichnet. Dabei ist die gepunktete Linie Reihe 4, die gestrichelte Linie Reihe 3 und die durchgezogene Linie Reihe 2, also die beste Approximation. Reihe 4, die für einen Abstand P/QU von 30 um berechnet wurde (Reihe 2 40 um), scheint im aufsteigenden Teil eine bessere Näherung zu geben, aber das Minimum dieser Kurve ist zu früh und eine Verschiebung dieses Minimums durch änderung der Diffusionskonstante würde die Anpassung wiederum verschlechtern.

Eine Vergrösserung des Rechtecks selbst bei Beibehaltung der Abstände von QU und P zum Rand blieb allerdings erwartungsgemäss ohne signifikanten Einfluss auf die Güte der Näherung. Für diese Grösse ist nur die untere Grenze von Bedeutung, das heisst, dass weder P noch QU zu nahe an irgendeinem Rand liegen dürfen (siehe Punkt 10.2.). Dass grössere Verschiebungen, etwa eine drastische Vergrösserung des Abstands bei gleichzeitiger Variation der Diffusionskonstanten, um den Zeitverlauf wieder anzugleichen, nicht zum Ziel führen, wurde bereits im vorhergehenden Punkt gezeigt.

Die ermittelten Abstände (etwa 40 um zwischen QU und P bei einer Seitenlänge des Rechtecks von grösser oder gleich 300 um) liegen durchaus in einer plausiblen und physiologisch sinnvollen Grössenordnung. Die Güte der Näherung ist für diese Werte einigermassen zufriedenstellend, wenn man

berücksichtigt, dass der aufsteigende Ast der experimentellen Kurve durch vielerlei Einflüsse verändert werden kann (aktive Prozesse der Ca - Regulierung, Änderung des extrazellulären Volumens etc.). Man kann also davon ausgehen, dass die geometrischen Bedingungen in etwa die tatsächlichen Verhältnisse innerhalb des untersuchten Gewebes wiedergeben. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Zahlenwerte der Abstände nicht die geometrischen Entfernungen, sondern die Diffusionsstrecken angeben, die in der Regel grösser als der direkte Abstand sein werden. Auch die Grösse der Diffusionsfläche ist, wie bereits erwähnt, vermutlich grösser als die physikalisch vorhandene Zwischenschicht. Trotzdem sollten die hier gewonnenen Werte ausreichend genau bestimmt sein, um einige Schlussfolgerungen daraus zu ziehen.

3.4.5. Schlussfolgerungen

Eine wichtige Folgerung aus den gezeigten Ergebnissen ist die Abschätzung der Diffusionskonstanten, die durch Angleichung der rechnerischen an die experimentellen Verzögerungen gewonnen werden kann. Für die bereits angegebenen Dimensionen ergibt sich für diese Konstante ein Wert von etwa 2000 (um*um/s) oder 2*10E-5 (cm*cm/s). Dieser Wert ist recht gut vereinbar mit den auf die Temperatur von 37C extrapolierten Angaben der Literatur (z.B. D'Ans,J. und Lax,E. Taschenbuch für Chemiker und Physiker 1949). Es zeigt sich aber auch, dass eine Berücksichtigung eines Korrekturfaktors für die Tortuosität, der nach den vorliegenden Arbeiten etwa 2.4 betragen müsste (Nicholson und Phillips, 1982 und Nicholson, Phillips und Gardner-Medwin, 1979), keine passende LÖsung der Diffusionsgleichung unter diesen Bedingungen ergibt. Dies ist aber erklärlich durch Betrachtung der angenommenen Grössenordnungen und der damit zusammenhänden unterschiedlichen Randbedingungen. Wie bereits

erwähnt, wird in diesen Arbeiten die freie dreidimensionale Diffusion als Modell verwendet. Der Abstand zwischen Quelle (es wurde in diesen Versuchen eine Iontophorese - Elektrode als Ionenquelle verwendet) und Ableitelektrode war stets grösser als 80 bis 100 um (geometrische Entfernung, also war die Diffusionsstrecke um den Tortuositätsfaktor grösser). Über solche Entfernungen kann das dazwischenliegende Gewebe in erster Näherung als isotrop und homogen angenommen werden, wobei zur Anpassung an die tatsächlichen Diffusionsverhältnisse eben die erwähnte Tortuosität und die Volumenfraktion verwendet werden. Die Grösse der Zellkörper selbst sowie der Axone und Dendriten lässt aber eine solche Annahme über Entfernungen von weniger als etwa 50 um wenig plausibel erscheinen. Umgekehrt wird die Annahme der zweidimensionalen Diffusion vermutlich bei grösseren Entfernungen keine zutreffende Näherung mehr darstellen. Für Überlegungen hinsichtlich der Beeinflussung neuronaler Aktivität durch Diffusionsvorgänge (siehe Nicholson und Phillips, 1981) ist das zweidimensionale Modell aber vermutlich wesentlich besser geeignet als die hier zu grobe Korrektur durch globale Faktoren.

Für eine genauere Untersuchung der Vorgänge bei der Aktivierung der Ca - Kanäle und der damit verbundenen plastischen Prozesse wäre es nützlich, Informationen über den genauen Ort dieser Ca - Leitfähigkeiten zu besitzen. Wie bereits gezeigt, befinden sie sich mit grosser Wahrscheinlichkeit auf der postsynaptischen Seite der zu verändernden Synapsen. Es gibt einige Hinweise, dass es sich dabei um Kanäle an den Dendriten der beobachteten Neurone handelt. Betrachtet man beispielsweise die in Bild 11 dargestellten Ergebnisse, so ist hier die Überlagerung zweier deutlicher Ca - Antworten zu sehen. Die Amplitude der Signale sowie deren relativ kleine Verzögerung lässt darauf schliessen, dass sich zwei Ca - Senken in unmittelbarer Nachbarschaft befinden (etwa 150-250 um, siehe auch Punkt 4.). Auf eine so kurze Distanz müsste aber ein

somatisches Aktionspotential unbedingt im Signal der Referenzelektrode sichtbar sein. Da dies nicht der Fall ist, und die entsprechenden Neurone mit grösster Wahrscheinlichkeit zu diesem Zeitpunkt durchaus aktiv sind, befindet sich die Ableitelektrode relativ weit vom Zellkörper entfernt. Das heisst, dass sich auch die Ca - Senken zumindest nicht in unmittelbarer Nähe des Somas befinden.

Auch bei anderen Messungen, die hier nicht gezeigt wurden, konnten oft relativ grosse Ca - Signale gemessen werden, ohne dass Anzeichen dafür vorhanden gewesen wären, dass sich die Elektrode in unmittelbarer Nachbarschaft des Zellkörpers befand. Man kann also davon ausgehen, dass die hier aktivierten Ca - Leitfähigkeiten tatsächlich im dendritischen Bereich zu finden sind.

Abschliessend soll noch die Grössenordnung der experimentell gemessenen Ca - Senken abzgechätzt werden. Eine prinzipiell mögliche direkte Rückrechnung aus den angepassten LÖsungen ergibt die Schwierigkeit, dass dazu von der zweidimensionalen Diffusion auf reale dreidimensionale Verhältnisse übergegangen werden muss. Dazu muss der Abstand zwischen den Zellmembranen, die die Diffusionsebene begrenzen abgeschätzt werden. Durch Multiplikation der zweidimensionalen Konzentrationen mit diesem Abstand kann dann die tatsächliche Konzentrationsänderung errechnet werden. Am Ort der Ableitelektrode selbst ist aber vermutlich durch den Totraum vor der Elektrodenspitze und die Deformation des umgebenden Gewebes durch die Spitze die Annahme der zweidimensionalen Diffusionsschicht nicht mehr gültig. Diese Störung spielt keine Rolle, solange das gestörte Volumen klein ist gegenüber dem Restvolumen und solange man sich nur für relative Konzentrationen interessiert. Bei der Bestimmung der absoluten Konzentrationsänderung spielen diese Einflüsse aber eine nicht mehr vernachlässigbare Rolle. Da die Totraumvergrösserung

immer eine Verringerung der gemessenen gegenüber der tatsächlichen Konzentration zur Folge hat, kann aber eine untere Grenze für die tatsächliche Stärke der Ca - Senken abgeschätzt werden.

Da die Störeinflüsse doch verhältnismässig gross sind, genügt es, grobe Schätzwerte als Grundlage der Rückrechnung zu verwenden. Dazu sei das Maximum der gemessenen Konzentrationsänderung als etwa 50 uM angenommen, die Amplitude der angepassten rechnerischen Lösung als etwa 5*10E-4 (Einheit ist die Quellenstärke N in Mol/um^3). Die Dicke der Diffusionsschicht kann mit etwa 0.5 um angenommen werden. Durch Gleichsetzung folgt dann:

$$0.5*5*10E-4*N\ (Mol/um^3) = 50*10E-6\ (Mol/dm^3)$$

$$\Rightarrow N = 0.5*10E-16\ (Mol)$$

Die gesamte Quelle, summiert über die Einschaltzeit, hat also eine Stärke von etwa 5*10E-5 pMol.

Es ist instruktiv, nachzurechnen, welches Volumen an extrazelluläre FLüssigkeit notwendig ist, um diese Menge zu liefern. Bei einer extraz. Ca - Konzentr. von etwa 1 mM ergibt sich für das Volumen V

$$V = 5*10E-17/10E-3\ (dm^3) = 50\ (um^3)$$

Falls das Volumen kugelförmig angenommen wird, ist der Radius dann

$$R = 2.29\ um$$

Bezieht man die Volumenfraktion, also das Verhältnis Extrazellulärraum zu Gesamtvolumen mit ein, das kleiner etwa 30% ist, wird das benötigte Volumen entsprechend grösser. Da die Diffusionsverhältnisse lokal doch stark eingeschränkt sind und das Ca also nicht sehr schnell nachgeliefert werden kann, kann man daraus schliessen, dass die Ca - Senken, die ja im Modell als punktförmig angenommen wurden, doch über einen relativ grossen Bereich verteilt sein müssen (der aber immer noch klein gegen den Abstand zur Ableitelektrode ist).

Eine Umrechnung der transportierten Ladung (2*96500*5*10E-17 As) in den für die Einschaltdauer (500 ms) fliessenden Strom ergibt eine Durchschnittsstromstärke von etwa 20 pA. Man kann diesen Wert nun wieder mit Abschätzungen für die Stromdichte neuronaler Membranen in Beziehung setzen. Für Kaliumionen werden dafür Werte von etwa 10E-13 A/um^2, also 0.1 pA/um^2 angegeben (Lux und Neher, 1973, Dietzel et al. 1980). Nimmt man nun für die Ca - Ströme eine ähnliche Grössenordnung an, ergeben sich Flächen von etwa 200 um . Dies ist ebenfalls ein relativ grosser Wert, der auch auf eine einigermassen breite Verteilung der Ca - Leitfähigkeiten hinweist.

Eine Rückrechnung der Konzentrationen auf kureze Entfernungen, also in der unmittelbaren Umgebung der Senken, ist deshalb nicht quantitativ möglich, da bei einer solchen Annäherung die Annahme einer Punktquelle nicht mehr zutrifft. Eine ungefähre Abschätzung lässt aber die Vermutung zu, dass lokal starke Schwankungen der Ca - Konzentration auftreten, die auch längere Zeit erhalten bleiben können. Ein Einfluss dieser Konzentrationsschwankungen auf die Aktivität umliegender Neurone ist also nicht auszuschliessen. Eine Modifikation der Erregbarkeit der betroffenen Neurone selbst, speziell der aktivierten Synapsen, ist bei solchen Grössenordnungen sogar als einigermassen wahrscheinlich anzunehmen.

Wie gezeigt wurde, kann aus der Anwendung der Diffusionsgleichung auf exp. Resultate einige Information über die lokale Mikrostruktur gewonnen werden. Eine Erweiterung der Anwendung auf andere Ionensorten und eine sorgfältigere Analyse der Randbedingungen könnte auf diesem Gebiet noch einige Fortschritte bringen.

4. Diskussion

4.1. Methoden

4.1.1. Auswertung

Die tatsächlich gemessene Änderung der Ca -Konzentration hängt in kritischer Weise vom Abstand der Ableitelektrode zum Ort der Ca -Senke ab (siehe dazu auch Punkt 3.4.). Bei zu kleinen Abständen überfordert die Änderung der Konzentration den Dynamikbereich der Verstärker und speziell auch des Analogbandes und der Analog-Digital-Wandler des Rechners (siehe dazu Punkt 2.2.). Bei zu grossen Abständen verschwindet die Amplitude des Konzentrationsabfalls unterhalb der Rauschgrenze. Da diese Grenze von der Empfindlichkeit und dem (auch während einer Messung variablen) grossen Widerstand der Elektrode (grösser als 2 Gigaohm) abhängt, kann die Gültigkeitsgrenze für den Abstand nicht von vornherein festgelegt werden. Die aus diesen Gründen nicht verwertbaren Daten können also erst im Zuge der Auswertung ausgesondert werden.

Bei sehr kleinen Abständen zwischen Elektrode und Zelle können auch noch die unvermeidbaren mechanischen Bewegungen der Elektrode wegen des hohen örtlichen Konzentrationsgradienten ihrerseits wieder starke Veränderungen des Signals auslösen. Berührt die Elektrode die Membran des abzuleitenden Neurons, kann es zu Verletzungsentladungen und zu unphysiologisch grossen Ca -Leckströmen kommen. In diesen Fällen kann durch eine Synchronisaton der Gewebebewegungen durch die Kreislaufwirkungen der elektrischen Reize eine Korrelation zwischen diesen und den Messparametern vorgetäuscht werden, die tatsächlich nicht vorhanden ist. Auch hier ist eine Beurteilung der Sachlage erst bei der Auswertung der Daten möglich.

Für die quantitative Auswertung, besonders der Kinetik der Ca -Ströme, kann sich auch die weitere Umgebung störend bemerkbar machen. Falls mehrere Ca - Senken im Messbereich der Elektrode liegen, wird das Signal in seinem zeitlichen Ablauf und seiner Amplitude empfindlich verändert. Dies ist insofern ein Problem, als aufgrund der kolumnären Organisation benachbarte Neurone ähnliche rezeptive Felder haben und deshalb annähernd zeitgleich aktiviert werden. In der Praxis sind allerdings die Abstände zwischen den einzelnen Zellen meist zu gross, als dass sich zwei gleichzeitig im Messbereich der Elektrode befinden würden. Eine Ausnahme zeigt Bild 11A, in dem vor allem in der obersten Reihe (Zeitbasis 20 s) ein erster, relativ starker Abfall von einem zweiten, flachen gefolgt wird. Es handelt sich hier um Messungen im Raum zwischen 2 Neuronen, also ohne dass die Aktivität eines Neurons im Signal der Referenzelektrode sichtbar gewesen wäre (Optimierung der Reize nach den Eigenschaften der zuletzt gefundenen Zelle.) Der Schluss liegt nahe dass es sich um die Ca -Antwort zweier verschiedener Zellen handelt, die sich am Ort der Ableitelektrode zeitverschoben aufsummieren. Dies war aber, wie gesagt, eine Ausnahme. Bei Messungen in unmitelbarer Nähe eines Neurons kann davon ausgegangen werden, dass nur das Signal dieses einen Neurons gemessen wurde.

Die durch die ionensensitiven Elektroden gemessenen Werte sind im wesentlichen Konzentrationen und damit (bei gegebener absoluten Menge an Ca-Ionen) abhängig von der Grösse des Volumens, in dem gemessen wird, also des Extrazellulärraums (EZR). Dieser Raum verändert sich aber selbst, unter Umständen stark reizabhängig, während der Messung (Dietzel, Heinemann, Hofmeier und Lux, 1980), wodurch die Messungen verfälscht werden können. Speziell könnte bei einer entsprechenden Verringerung des

EZR ein Abfall der extrazellulären Ca -Menge keinen entsprechenden Abfall, sondern u.U. sogar einen Anstieg der extrazellulären Ca -Konzentration nach sich ziehen. Da dies aber nur bei sehr starker elektrischer oder pharmakologischer Reizung in grösserem Umfang zu sehen ist und die hier verwendeten Reize schwach sind, dürfte die Auswertung dieser Versuche davon nur wenig beeinflusst werden.

Es müssen also bei der Auswertung alle diejenigen Messungen unberücksichtigt bleiben, bei denen einer oder mehrere dieser Störfaktoren aufgetreten sind. Wird eine solche Auswahl zugelassen, so ist die Schwankungsbreite der Ergebnisse relativ klein.

4.1.2. Mathematische Behandlung der Diffusion

Die in Punkt 3 aufgestellte Diffusionsgleichung beruht auf der Annahme einer zweidimensional eingeschränkten Diffusion entsprechend der dort angegebenen Modellvorstellung. Die Parameter dieser Gleichung, die zur Anpassung der Lösungen an gegebene Daten verwendet werden können, sind die Grösse des ausgewählten Rechtecks, also XRAND und YRAND, die Position der Quelle und des Beobachtungspunkts, (XQU,YQU) und (X,Y) und die Diffusionskonstante KDIF. Dies entspricht einer Modellvorstellung, wie sie in Bild 22 gezeigt ist. In den Lösungansatz der Gleichung mit eingegangen ist bereits die Randbedingung für das Verhalten bei x=XRAND und Y=YRAND (siehe 3.4.), mathematisch also

------- = 0 für alle (x,y) mit x<0 oder x>XRAND und y<0 oder Y>YRAND

In dem Modell von 3.4. befindet sich ausserhalb der Membranschicht zwischen M1 und M2 ein im Vergleich zur Zwischenschicht sehr grosses Volumen konstanter Konzentration. Dies ist aber keineswegs den physiologischen Gegebenheiten entsprechend. Das Volumen bleibt im ZNS zwar im wesentlichen auf flache Schichten beschränkt die sich aber stark verzweigen. Betrachtet man die Zunahme des verfügbaren Diffusionsvolumens als Funktion der Entfernung vom Ableitort, so wächst die Steigung dieser Volumenzunahme an jedem dieser (auch dreidimensional fortgesetzten) Verzweigungen stark an. FÜ grössere Entfernungen kann das Volumen also in erster Näherung als gross gegenüber dem Volumen der Zwischenschicht angenommen werden. Man kann nun den Rand des betrachteten Rechtecks von der Begrenzung der physikalisch vorhandenen quasizweidimensionalen Fläche rechnerisch vergrössern (auf die Fläche von X1 bis X2). Die Auswirkung für nicht zu nahe am Rand liegende, also speziell sich innerhalb des ursprünglichen Bereichs befindliche Punkte ist dieselbe, wie wenn die zweidimensionale Fläche bis zu X1 bzw X2 fortgesetzt wäre und dort sprunghaft in ein unendlich ausgedehntes Volumen übergehen würde. Die in den Rechnungen verwendeten Werte von XRAND und YRAND entsprechen also nicht der tatsächlichen geometrischen Ausdehnung der betrachteten Fläche sondern dem korrigierten (zu grossen) Wert, der empirisch ermittelt wurde. Wie gezeigt wurde, ist die Wahl dieses Randes bei nicht zu kleinen Abständen vom Rand relativ unkritisch für die Kinetik der betrachteten Vorgänge.

Da die im Modell als rein zweidimensional angenommene Fläche in Wirklichkeit stark gekrümmt sein kann (folgend der ungleichmässigen Form der Zellkörper), sind auch die Abstände von QU zu P nicht direkt als geometrische Abstände interpretierbar. Die reale Entfernung wird vermutlich kleiner (höchstens gleich) der durch die Modellrechnung gewonnenen Distanz sein.

4.2. Interpretation der Ergebnisse

Die im Ergebnisteil gezeigten Resultate zeigen eindeutig, dass Ca - Leitfähigkeiten corticaler Neurone genau dann auftreten, wenn die angebotenen Reizparameter die Bedingungen erfüllen, die in anderen Experimenten erfüllt werden mussten, um zu plastischen Veränderungen im visuellen Cortex zu führen. Da das Einsetzen von Ca - Antworten nicht oder zumindest nicht ausschliesslich durch eine erhöhte Aktivität des Neurons verursacht wird, ist die Abhängigkeit der Ca - Kanäle von der neuronalen Aktivität nichtlinear und durch andere Einwirkungen beeinflussbar. In Bezug auf die in der Einleitung erwähnte Fragestellung kann also folgendes festgestellt werden:

Das Auftreten plastischer Veränderungen im visuellen Cortex junger Katzen ist begleitet von einem Ca - Einstrom in die postsynaptische Membran des betreffenden Neurons. Die Aktivität dieser Ca - Leitfähigkeiten erfüllt alle Bedingungen, um als auslösendes Moment für zumindest kurzzeitige Lernprozesse fungieren zu können. Sie hängt ab von der gleichzeitigen Anwesenheit eines unspezifischen modulierenden Signals, das alle Eigenschaften des geforderten " now -print " -Signals aufweist.

4.2.1. Kalzium

Wie die quantitativen Berechnungen im Ergebnisteil zeigen, ist die Menge des in die Neurone einströmenden Kalziums gross genug, um eine Vielzahl

von Vorgängen innerhalb der betroffenen Zelle in Gang zu setzen. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, gibt es eine ganze Reihe von Untersuchungen, die die Existenz solcher Mechanismen nachweisen.

Einerseits wird Kalzium bei grundlegenden biochemischen Vorgängen als Reaktionspartner benötigt, andererseits hat es auch sehr grosse Bedeutung als " second messenger " bei der Steuerung metabolischer Vorgänge durch elektrische Signale, wobei dies meist über die Aktivierung von Enzymen wie Calmodulin, Calcineurin oder anderer geschieht. Auch bei der Steuerung der Gen-Expression als Mittel zur Anpassung der Eigenschaften einer Zelle an spezifische Aufgaben ist Ca beteiligt. (Rodan et al, 1978; Fambrough und Devroetes,1978).

Über die Regulierung des axoplasmatischen und möglicherweise auch des dendroplasmatischen Transports kann Kalzium steuernd in Auf- und Abbauvorgänge der Membran eingreifen, ebenso wie durch Veränderung der Viskosität von Axo- und Dendroplasma die Motilität der Zellen gesteuert werden kann (Porter, 1976, Hodgkin und Katz, 1949).

Intrazelluläre Wirkungen von freiem Ca treten nur transient nach einem mehr oder weniger langen Ca -Einstrom auf, sodass die Suche nach der Existenz von Ca -Kanälen in der Membran von Nervenzellen eine Frage von generellem Interesse ist. In Invertebraten wurden solche Ca -Leitfähigkeiten bereits vor längerer Zeit sowohl in vivo als auch in Slice - Präparationen und in Zellkulturen gefunden (Geduldig und Junge, 1968, Geduldig und Grüner. 1970; Kostyuk et al 1974, 1977, Eckert und Lux 1976; Horn 1977, Kandel 1981).

In neuerer Zeit wurden mit einer Verbesserung der Untersuchungsmethoden

auch an Vertebratenneuronen ähnliche Entdeckungen sowohl im Slice (Dichter und Fischbach, 1977) als auch in der Kultur (Moolenar und Spector, 1977) und in vivo (Purpura,1967) gemacht. Es stellte sich dabei heraus. dass Ca- Kanäle sehr spezifische, stark von Art und Entwicklungszustand der Neurone abhängige Eigenschaften besitzen.

So wurde für die untere Olive im Hirnstamm des Meerschweinchens im Slice-Präparat gezeigt, dass es zusätzlich zu den gewöhnlichen Na -Aktionspotentialen noch eine lange (ca. 10ms) andauernde Depolarisation gibt, die durch einen Ca -Einstrom ausgelöst wird (Llinas und Yarom, 1981 a,b). Diese Ca -Kanale sind vermutlich auf die Dendriten beschränkt, wie es auch schon für andere Ca -Leitfähigkeiten gezeigt wurde, so für die Purkinjezellen des Cerebellum (Llinas und Sugimori, 1978,1980), und die Pyramidenzellen des Hippocampus (Wong et al 1979, Schwartzkroin und Slawsky, 1977). Dise Kanäle werden durch eine relativ starke Depolarisation (ca. 30 mV vom Ruhepotential aus) aktiviert und können auch ohne einen Na -Strom ein Aktionspotential erzeugen. Eine zusätzliche Wirkung des Ca -Einstroms ist die Aktivierung eines langsamen Kalium-Ausstroms, der eine langandauernde Nachhyperpolarisation (ca 80 - 100 ms) verursacht. Ein ähnlicher Mechanismus könnte in Pyramidenzellen der Ratte (Nicoll und Alger, 1981) oder in Motoneuronen der Katze (Krnjevic et al, 1975) auftreten.

Auch bei in-vivo Experimenten wurden, beispielsweise im Motorcortex der Katze (Heinemann und Pumain, 1980) Hinweise gefunden. dass neben den Kanalen für Ca in den präsynaptischen Terminalen weitere Ca -Kanäle existieren, durch die Ca in die postsynaptischen Zellen gelangen kann.

Diese Kanäle sind alle dadurch charakterisiert, dass sie

spannungsgesteuert sind (wenn auch mit sehr unterschiedlichen Kennlinien) und durch bestimmte toffe (Kobalt, Mangan) blockierbar sind. Allerdings scheinen die Ca -Kanäle im Cortex der Katze weniger als in anderen Arealen (wie dem Cerebellum etc.) ein normaler Bestandteil der Ionenströme eines A.P.s zu sein. So ist die durch elektrische Stimulierung hervorrufbare Ca -Aktivität im Motorcortex der (erwachsenen) Katze nicht in allen Cortexschichten gleich (Heinemann et al, 1981). Es gibt Hinweise, dass diese Ca - Mechanismen bei " spreading depression " und bei den Vorgängen bei epileptischen Anfällen eine Rolle spielen (Heinemann et al. 1977, Nicholson et al 1978).

4.2.2. Now-Print-Befehl und neuronale Ensembles

Es bleibt die Frage nach der Natur des zusätzlichen modulierenden Signals ("Now - Print" Befehl), das eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierung der Ca - Kanäle ist. Dieses Signal, das für das Aus- und Einschalten der Ca - Kanäle verantwortlich ist, könnte funktionell gesehen seine Rolle für die Steuerung plastischer Vorgänge auch dann spielen, wenn es nicht durch Eigenschaften eines einzelnen Neurons erzeugt wird, sondern vielmehr aus dem Zustand des Gesamtsystems resultiert. Dieser Zustand wurde durch die Kopplungen aller in diesem System bzw. der zu einem bestimmten Ensemble zusammengeschalteten Neurone repräsentiert.

Der Begriff des Ensembles als der funktionellen Einheit mehrer Neurone besagt im wesentlichen, dass die Dekodierung einer bestimmten Information aus den angebotenen Daten nicht durch die Aktivität eines einzelnen,spezifischen Neurons sondern vielmehr durch das " Muster " der Aktivitätsverteilung der Mitglieder des Ensembles repräsentiert wird. Damit kann ein und dasselbe Neuron als Mitglied verschiedener Ensembles an

der Dekodierung verschiedener Arten von Information beteiligt sein. Zur Theorie der Ensembles siehe beispielsweise Grossberg, 1976 oder Grossberg et al., 1979.

Man kann aufgrund verschiedener Versuchsergebnisse annehmen, dass ein solches Ensemble in zwei verschiedenen, deutlich unterscheidbaren Zuständen existieren kann. Im Grundzustand, er soll hier als Relaismodus bezeichnet werden (Singer, 1980 c), wird eine durch die spezifischen Afferenzen in das Ensemble eingekoppelte Eingangskonfiguration in einem oder doch wenigen Schritten verarbeitet und führt mit einer bestimmten konstanten Wahrscheinlichkeit zu jeweils einer von mehreren Ausgangskonfigurationen. Diese bleiben nur so lange stabil, wie die Eingangskonfiguration vorliegt (abgesehen von adaptiven und habituierenden Vorgängen). Die Rückkopplungen, die in diesem Zustand im Ensemble aktiv sind, sind soweit gedämpft, dass die Gesamterregung von sich aus schnell wieder auf 0 absinkt. In diesem Zustand wird also die ankommende Information durch die lokale Struktur der Verschaltung dekodiert und mit geringer Verzögerung über die Ausgangskonfigurationen (also die Aktivität einzelner Neurone) an die nächsthöhere Stufe der Hierarchie weitergegeben.

Im zweiten Fall, er soll Resonanzzustand genannt werden, wird das Ensemble so weit selbsterregbar, dass eine einmalig eingespeiste Eingangskonfiguration zu einem mehrmaligen Durchlaufen von Aktivitätsschleifen führen kann. Die Stabilität des Systems wird hier nicht mehr statisch durch lokale Hemmungen oder ähnliche Prozesse gewährleistet, sondern dynamisch, indem zwar jedes Mitglied dieses Ensembles für sich immer wieder durch die zeitlich verzögert erfolgende

positive Rückkopplung aktiviert, aber durch die Hemmung dazwischen auch wieder " abgeschaltet " wird. Da die Pausen zwischen den einzelnen aktivierenden Phasen nur so kurz sein dürfen, dass die Hemmung wieder abklingen kann, wird der Gesamtaktivität dadurch eine obere Schranke gesetzt, das Ensemble also vor ungedämpften Schwingungen gesichert. In diesem Zustand werden ankommende Informationen zwar ebenfalls innerhalb des Netzwerks verarbeitet und eine Ausgangskonfiguration erzeugt, aber diese Konfiguration muss nicht unbedingt zeitlich stabil sein. Es gibt beispielsweise die Möglichkeit, durch Wechselwirkungen mit anderen funktionell getrennten Ensembles, die aber physikalisch einige gemeinsame Mitglieder haben, die Art der Informationsverarbeitung zeitabhängig zu modifizieren (siehe Bild 28).

Die potentielle Aktivierung der Ca - Kanäle kann in diesem Fall durch den Übergang vom Relais- in den Resonanzzustand erfolgen. Durch die Möglichkeit, die Entstehung und Funktionsweise der Ensembles und damit auch die Art der Informationsverarbeitung auf vielfältige Weise zu steuern, können alle für die Steuerung plastischer Prozess geforderten Einwirkungsmöglichkeiten verwirklicht werden.

Dieser Vorstellung nach ist es also der Übergang vom Relais- in den Resonanzmodus, der das permissive Signal für die Aktivierung der Ca - Kanäle darstellt. Die genaue physikalische Realisierung dieses Übergangs ist noch ungeklärt. Es könnte sich dabei um eine Verstärkung der synaptischen Transmission durch die Verringerung der unspezifischen Hemmung handeln, die auf Grund lokaler Prozesse nicht in der somatischen Aktivität der beteiligten Neurone zu beobachten ist. Möglicherweise handelt es sich auch um Einflüsse, die nicht die Übertragung selbst, sondern nur die Auswirkung des entstehenden EPSPs bzw. IPSPs modifizieren. Wird beispielsweise der Längswiderstand der Membran oder

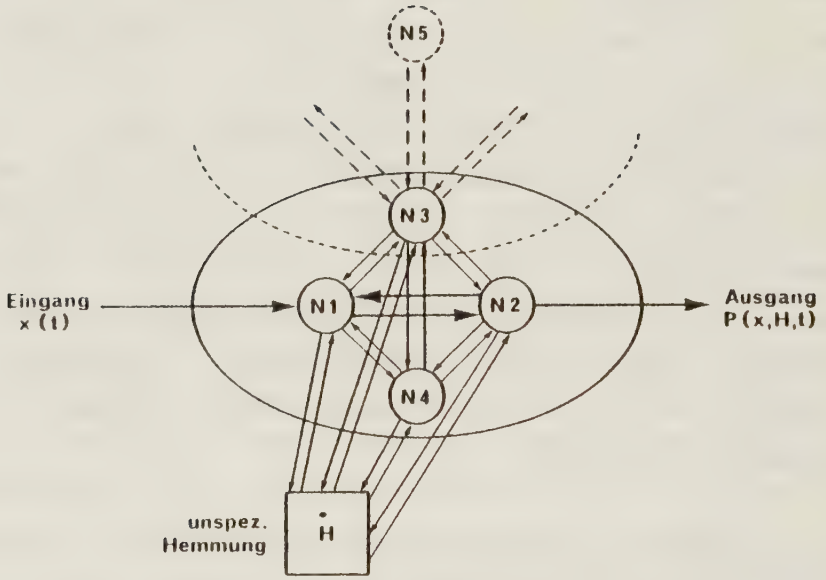


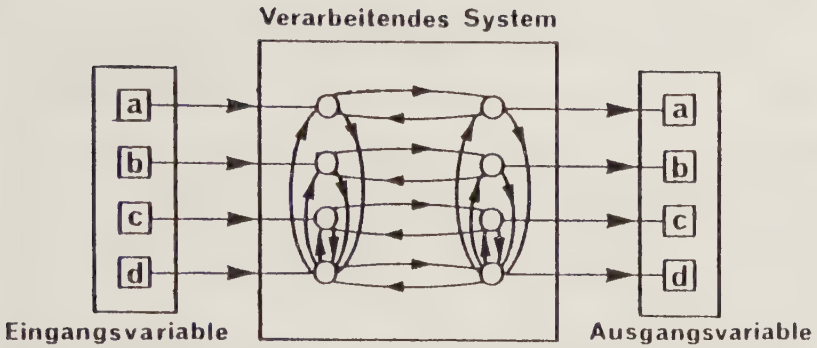
Bild 28 Schemazeichnung eines Ensembles bestehend aus 4 untereinander verschalteten Neuronen. Dabei überwiegen die Verbindungen zwischen N1 und N2, N1 (der Eingang) kann N2 (den Ausgang) auch im Relaismodus aktivieren, ohne dass N3 und N4 angesprochen werden. Im Resonanzfall aktivieren sich diese Neurone gegenseitig. Da N3 auch zu einem anderen (gestrichelt gezeichneten) Ensemble gehört, kann dadurch auch die Aktivität dieses Ensembles für das Verhalten der Neurone N1 bis N4 eine Rolle spielen.

deren Kapazität in der Umgebung der Synapse erhöht (etwa durch Änderung der Isolationseigenschaften der Membran oder der Eigenschaften der umgebenden Gliazellen) und/oder der Querwiderstand so weit erniedrigt, dass nicht zu vernachlässigende Querströme auftreten, ist die elektrotonische Weiterleitung der Membranspannungsschwankungen behindert. Dadurch bleiben unter Umständen Depolarisationen, die vorher ein Aktionspotential ausgelöst hätten, unter dieser Schwelle. Dieselbe Argumentation gilt für Veränderungen der Geometrie des Dendriten oder Axons in der Umgebung der Synapse. Vor allem die Summation von EPSPs bzw IPSPs, die von mehreren Synapsen ausgehen, kann durch Änderungen des Querschnitts oder der Länge von Dendriten stark beeinträchtigt werden

Auf eine noch zu klärende Weise signalisieren diese zusätzlichen Aktivitäten innerhalb des Ensembles nun die Möglichkeit der Aktivierung lokaler Ca - Leitfähigkeiten. Es könnte sein, dass es die stärker ausgeprägten Schwankungen des Membranpotentials der beteiligten postsynaptischen Membranen sind, die spannungsgesteuerte Ca - Kanäle aktivieren (siehe Llinas und Yarom, 1982a und b). Es wäre aber auch möglich, dass ein zusätzlicher Transmitter, ausgeschüttet durch in den Resonanzschleifen aktivierte Terminale, diese Kanäle aktivieren kann (diskutiert werden in diesem Zusammenhang unter anderem Norepinephrin und Acetylcholin). Auf alle Fälle werden durch das einströmende Ca die Transmissionseigenschaften der betroffenen Synapsen vermutlich durch Veränderungen bestimmter Kanalproteine, möglicherweise aber auch durch ultrastrukturelle und damit sehr schnelle Wachstumsprozesse verändert. Wird jetzt in der Folge dieses Ensemble wieder durch dieselbe Reizkonfiguration angesprochen, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Synapsen das postsynaptische Neuron bereits im Relaismodus aktivieren können, stark erhöht. Dadurch kann das Ansprechen dieses Ensembles auf diesen bestimmten Stimulus hin gezielt verbessert werden. Das Netzwerk hat also eine bestimmte Musterkombination gelernt.

4.3. Funktionelle Bedeutung der Plastizität

Die plastischen Prozesse, mit denen sich die entwickelnden biologischen Systeme ihrer Umwelt anpassen, laufen in mehreren, zeitlich aufeinander folgenden Stufen ab. Charakteristisch für die frühen Entwicklungsstufen der sensorischen Systeme ist das schlechte Auflösungsvermögen, das erst im Laufe der Entwicklung kontinuierlich verbessert wird (Barlow und Pettigrew, 1971). Das bedeutet, dass zu Beginn dieser Entwicklung ähnliche Informationseingänge zu identischen Sinneseindrücken führen. Die Ausgangszustände, die mit diesen Sinneseindrücken verknüpft sind (siehe Bild 29), sind ebenfalls nicht exakt definiert sondern es werden mehrere ähnliche,aber unterschiedliche Ausgangszustände mit dem gleichen Sinneseindruck identifiziert. Durch die randomisierte Verschaltung existiert für jede der möglichen Ausgangskonfiguratione (IIa bis IId in Bild 29A) eine bestimmte Wahrscheinlichkeit, von einer der möglichen Eingangskonfigurationen (Ia bis Id in Bild 29A) aktiviert zu werden (Verteilung P(x) in Bild 29B). Wenn nun ein Vorgang existiert, bei dem oft benützte Verarbeitungsschleifen (unter Einbeziehung der Rückkopplungen im System selbst) bevorzugt gefestigt, weniger benutzte dagegen abgebaut werden, wird jede Abweichung der Aktivierungswahrscheinlichkeit P(x) von ihrem Mittelwert im Laufe der Zeit verstärkt werden, und die vorher annähernd gleichmässige Verteilung geht über in eine selektive Empfindlichkeit des Ausgangszustands für eine ganz bestimmte Eingangskonfiguration. Es wurden in der Vergangenheit bereits mehrere mathematische Modelle veröffentlicht, die diese oder ähnliche Bedingungen erfüllen (beispielsweise Bienenstock et. al. 1982, Grossberg, 1979,1982). Die Übertragung der aus solchen Modellrechnungen gewonnenen Schlussfolgerungen auf die physiologischen Gegebenheiten scheitert meistens daran, dass sich die Parameter der mathematischen Theorie nur sehr schwer mit experimentell zugänglichen Daten identifizieren lassen.



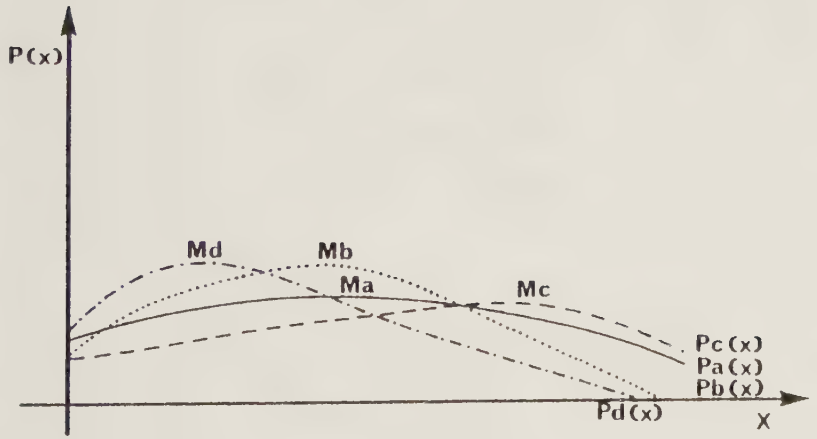


Bild 29 A Modellvorstellung zur Informationsverarbeitung. Einer der 4 möglichen Eingangsvariablen (z.B. eine von 4 Orientierungen) wird durch die Verarbeitung im System einen der 4 Endzustände aktivieren (beispielsweise ein Neuron des visuellen Cortex).

B $P_a(x)$ bis $P_d(x)$ sind die Empfindlichkeitskurven für die Ausgangsvariable.

Deshalb lassen sich auch die mathematischen Schlussfolgerungen nur unter grossen Schwierigkeiten mit verifizierbaren Prognosen verbinden.

Ein Modell für einen lokalen Ablauf, der auch versuchstechnisch überprüfbar scheint, bietet die schon in Punkt 2. beschriebene "Hebb - Synapse" (Hebb, 1949). Es wurde allerdings durch zahlreiche Experimente gezeigt (siehe auch Punkt 2.2.), dass zu den einfachen. lokalen Abhängigkeiten noch ein übergeordnetes Kontrollsystem notwendig ist. das global für bestimmte Bereiche die plastischen Prozesse ein- und ausschalten kann. Ausserdem ergeben sich noch einige andere Schwierigkeiten, falls man diese Regeln auf ein Gesamtsystem miteinander verbundener Neurone anwenden will. So ist, wie bei allen Regelkreisen. die die die Möglichkeit einer positiven Rückkopplung enthalten, die Gefahr der ungedämpften Schwingung durch Selbsterregung gegeben. Die Hebb - Regeln selbst können dies nicht verhindern, da sie ja keinerlei Information über die Gesamtaktivität des Systems beinhalten. Bei einer durch diese Regeln bestimmten änderung synaptischer Effizienzen würde jede positiv rückkoppelnde Schleife automatisch zu einer Erhöhung der damit verbundenen Kopplungsfaktoren und damit einer Verstärkung der Rückkopplung führen, was eine starke Instabilität des Systems zur Folge hätte. Dieses Problem kann umgangen werden, indem ein zusätzlicher Mechanismus angenommen wird, der mit einer im Vergleich zu den informationsverarbeitenden Vorgängen innerhalb des Systems grossen Zeitkonstante zu einer Normierung der Gesamtaktivität führt (siehe beispielsweise Grossberg, 1977a,b, 1982; Kohonen et. al. 1977).

Durch den oben geschilderten Anpassungsvorgang, der für alle Ausgangskonfigurationen des Systems gilt, erwirbt das System die Fähigkeit, zwischen den einzelnen Eingangskonfigurationen sicher zu entscheiden, also seine " Auflösung " zu verbessern. Durch die

nichtlineare Kennlinie des Systems, entstehend durch die positiven wie negativen Rückkoppelungen, kann dabei schon eine sehr kleine änderung einzelner Kopplungsfaktoren eine erhebliche Veränderung des Gesamtverhaltens bewirken.

Handelt es sich beispielsweise um Neurone des visuellen Systems, könnte man die "Eingangskonfigurationen" mit der Orientierung eines Lichtbalkens identifizieren. Die Selektivität eines solchen Neurons für Orientierungen ist in der Regel beim unausgereiften Kortex relativ schlecht, es spricht also auf einen weiten Bereich von Orientierungen ziemlich gleichmässig an (Empfindlichkeitskurve P(x) in 29B). Werden nun alle möglichen Orientierungen mit gleicher Häufigkeit angeboten, wird sich die breite Verteilung durch die erwähnten Vorgänge verschärfen und das Maximum der Empfindlichkeit viel deutlicher ausgeprägt sein, das Neuron wird also orientierungsselektiv. Geschieht das mit mehreren Neuronen mit leicht unterschiedlicher Ausgangskennlinie, ergeben sich eine Reihe von Detektoren, die das System befähigen, scharf zwischen einzelnen Orientierungen zu unterscheiden.

Werden nun während der Entwicklung nicht alle Orientierungen gleichmässig angeboten, dann verändert sich die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung für einzelne Ausgangszustände. Anstelle der Wahrscheinlichkeiten P(x) muss für die Beurteilung des weiteren Verlaufs das Produkt aus der Empfindlichkeit P(x) und der Verteilung der Eingangsvariablen O(x) genommen werden (Bild 30). Das entstehende Maximum liegt dann, falls die Ausgangsfunktion P(x) nicht allzuweit von der Gleichverteilung abweicht, sehr nahe bei der häufigsten angebotenen Orientierung, ein Resultat, das durch Experimenten mit Orientierungsdeprivationen bestätigt wird. Es gibt nun sicherlich viele Neurone, deren ursprüngliche Empfindlichkeitsverteilung so weit vom

Maximum der angebotenen Eingangsvariablen weg liegt, dass sie bei einem gleichmässigem Angebot an Eingangsvariablen ihr Maximum bei einem anderen Wert erreicht hätte. Die Amplitude und auch die Schärfe des Tunings ist für solche Neurone dann sicher kleiner als bei den Neuronen, die von Natur aus einen ähnlichen Empfindlichkeitsbereich entwickelt hätten. Das erklärt die Tatsache, dass bei einer genaueren Untersuchung deprivierte Neurone im Mittel scheinbar eine schlechtere Selektivität zeigen als beim normalen Tier.

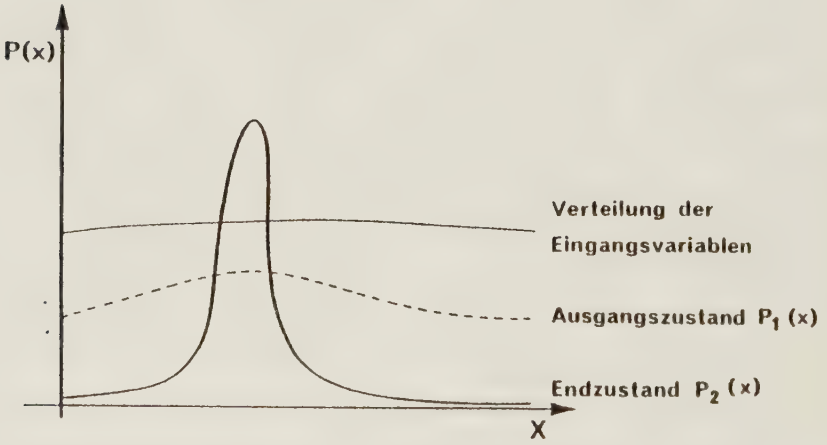


Bild 30 $P_1(x)$ zeigt die Empfindlichkeitskurve eines Ausgangszustandes, also die Wahrscheinlichkeit, mit der dieser Zustand durch die Eingangsvariable x aktiviert wird. $P_2(x)$ zeigt die stark verschärfte Empfindlichkeit, nachdem einige Zeit die Eingangsvariable x mit der oben gezeigten Verteilung angeboten wurde.

Der hier geschilderte Vorgang kann dann nicht gut funktionieren, wenn von vornherein viele Ausgangszellen identische Empfindlichkeiten haben, da dann auch die Wahrscheinlichkeiten für die Antwort auf verschiedene Eingangszustände identisch sind und damit keine Möglichkeit für die Differenzierung der Antwort gegeben ist. Da die P(x) aber unter Einbeziehung aller Verarbeitungsschleifen des Systems zustandekommen, genügt es bereits, wenn irgendwo in diesem System eine, wenn auch grobe, Systematik genetisch vorgegeben ist. Im Beispiel des visuellen Systems könnte diese Rolle durch die Schicht IV des visuellen Kortex übernommen werden, in der von Geburt an Zellen mit relativ differenzierter Funktion vorhanden sind (Hubel und Wiesel, 1963). Eine Begründung, warum dann nicht alle Zellen fest verdrahtet vorliegen können, wurde bereits gegeben (Anpassung der Verschaltung an die randomisierte Verteilung der Verbindungen, nicht ausreichende genetische Information, Anpassung an spezielle Umwelteinflüsse etc.).

Eine Entwicklung eines Netzwerks unter Verwendung von natürlich auftretenden Umwelteinflüssen nach den oben angegebenen Hebbschen Kriterien ist aber nicht geeignet, das Netzwerk tatsächlich hinsichtlich seiner Auflösung zu verbessern. Eine hauptsächliche Voraussetzung dafür ist nämlich, dass die Eingangsvariablen immer mit derselben statistischen Verteilung vorliegen, da sonst keine Stabilisierung irgendwelcher interner Verarbeitungsschritte möglich ist. Dies ist aber gerade beim sich entwickelnden System selten über längere Zeit hinweg der Fall. Nehmen wir als Beispiel wieder das visuelle System, und zwar speziell die Entwicklung der Binokularität eines Neurons. Die Entwicklung der Binokularität bewirkt, dass ein Neuron einer höheren Hierarchiestufe mit retinalen Rezeptoren von korrespondierenden Stellen des Gesichtsfeldes beider Augen verbunden wird. Dies muss mit sehr grosser Genauigkeit geschehen, da aus den Disparitäten von Netzhautbildern des ausgereiften Systems viele

Zusatzinformationen wie beispielsweise die Entfernung von Objekten berechnet werden. Würde nun der oben beschriebene Vorgang in unmodifizierter Weise ablaufen könnte damit recht gut erklärt werden, wie aus einer grob retinotopen Verschaltung der Afferenzen der beiden Augen eine fein abgestimmte binokuläre Korrespondenz entstehen kann.

Solange die optischen Achsen der beiden Augen nicht zu stark divergieren, ist durch die starke Überlappung der retinotopen Projektionen der Rezeptoren in der Ebene der Binokularität sichergestellt, dass es für jede Stelle des Gesichtsfeldes (mindestens) ein Neuron gibt, das passende Afferenzen von beiden Augen erhält und damit imstande ist, die eintreffenden Informationen binokulär zu integrieren. In dem Beispiel in Bild 31 wäre dies das Neuron N2, das Verbindungen zu den Rezeptoren Rl3 und Rr1 (des linken bzw. rechten Auges) besitzt. Zusätzlich hat N2 aber auch noch Afferenzen von Rl1 und Rl2, wie auch von Rr2 und Rr3, die von nicht übereinstimmenden Netzhautpunkten stammen und deshalb die Auswertung binokulärer Informationen stark erschweren. Werden nun beide Augen mit identischer, strukturierter optischer Information beschickt, dann werden im Durchschnitt die beiden Afferenzen Rl3 und Rr1 sehr viel korreliertere Aktivität zeigen als beispielsweise Rl1 und Rr2. Daraus folgt, dass es (abhängig von der Schwelle des Neurons N2) häufiger vorkommen wird, dass

Bild 31 Entstehung eines binokulären Neurons. N1, N2 und N3 Neurone, R_r1 bis R_r3 Rezeptoren des rechten Auges, R_l1 bis R_l3 Rezeptoren des linken Auges.

N2 aktiviert wird, wenn R13 und Rr1 aktiv waren, während die Aktivität eines einzelnen Eingangs alleine N2 nur selten aktivieren kann. Fordert man nun einen Prozess, der Synapsen bevorzugt stabilisiert, deren Aktivität häufig von einer Aktivierung des postsynaptischen Neurons gefolgt wird (etwa in Form der Hebbschen Postulate, siehe oben), so würden die Synapsen zwischen R13 bzw Rr1 und N2 verstärkt werden, während alle anderen kompetitiv abgekoppelt werden würden.

Mit Hilfe dieses Abbaus kann dann das Auflösungsvermögen des Systems, das unter der anfänglichen unexakten Verdrahtung stark leidet, verbessert und an die durch das Auflösungsvermögen der Rezeptoren der Retina gegebenen Grenzen angepasst werden.

Dies gilt jedoch nur, wenn die relative Lage der optischen Achsen der beiden Augen immer konstant ist. Da dies aber nicht der Fall ist, verschiebt sich die statistische Gewichtung der Aktivitätsverteilung der Afferenzen immer wieder und der Stabilisierungsprozess kann nie konvergieren. Es ist deshalb notwendig, noch zusätzliche Informationen zur Kontrolle dieses Vorgangs zu verwenden. Im Beispiel wäre dies die relative Position der beiden Augen.

Man könnte nun eine Rückkopplung innerhalb des Systems selbst annehmen, die irgendwie die Abweichungen der beiden Augenachsen feststellt und nur dann die plastischen Veränderungen zulässt, wenn die festgestellte Abweichung irgendeinen beliebigen, aber konstanten (und nicht zu grossen) Wert hat. Dies ist aber schon deshalb schwer möglich, weil das System zu Anfang seiner Entwicklung eben gerade die Informationen, die es zur Beurteilung der Zulässigkeit des vorliegenden Eingangsmusters braucht, noch nicht exakt genug dekodieren kann (siehe oben). Das heisst in diesem

Fall, dass die Beurteilung der relativen Augenstellung ein Auflösungsvermögen binokulalärer Information verlangt, die das System gerade erst lernen soll. Auch andere Einflüsse zerstören die Konstanz der Aktivitätsverteilungen. Es kann beispielsweise vom verarbeitenden System selbst nicht entschieden werden, ob ankommende Aktivität tatsächlich von der optisch erfassten Aussenwelt kommt oder ob es sich dabei um Spontanaktivität etwa während des REM-Schlafes handelt. Ein solcher Vorgang könnte also, wenn auch prinzipiell möglich, nur asymptotisch konvergieren und wäre durch andere Veränderungen im System selbst sehr leicht zu stören.

Eine weitere Schwierigkeit bieten alle Vorgänge, die mit einer Bewegung des Kopfes oder des ganzen Körpers verbunden sind. Auch hier kann nicht von vornherein unterschieden werden, ob sich jetzt das fixierte Objekt oder das Auge bewegt hat.

Eine einfache Möglichkeit zur Umgehung dieses Problems liefert die Annahme eines zusätzlichen Eingangs in das System, über den alle plastischen Vorgänge generell abgeschaltet werden können, ohne notwendigerweise die Aktivitäten sonst weiter zu beeinträchtigen. Dieser Eingang muss dann von einem Zentrum aus kontrolliert werden, das Zugang zu Informationen aus anderen Sinnesmodalitäten sowie aus Zentren des ZNS besitzt, die modalitätsübergreifende Funktionen haben. Mit Hilfe dieser Zusatzinformationen wird dann für jede Situation die Entscheidung getroffen, ob die notwendigen Randbedingungen (Wachzustand, Augenhaltung und Kopfhaltung stabil etc.) erfüllt sind. Die Aktivierung dieses Eingangs ermöglicht anschliessend die Realisierung plastischer Modifikationen. Ob und wenn ja welche plastischen Veränderungen dann tatsächlich auftreten, wird nur durch die oben angegebenen lokalen

Hebbschen Regeln bestimmt. Es handelt sich also um eine Steuerung (im Gegensatz zu einer Regelung mit Rückkopplungseffekten, siehe unten) der Plastizität nach bestimmten Auswahlkriterien. Die Art der Kriterien, also die Information, die zur Erzeugung des Steuersignals benützt wird, ist noch weitgehend unbekannt.

Wendet man die oben erwähnten Prinzipien nicht auf unreife Neurone mit einer flachen Kennlinie, also geringerer Spezifität an, sondern auf ausdifferenzierte Zellen mit einer schmalen Kennlinie analog zu Bild 30, können keine Veränderungen der Kennlinie durch diese Vorgänge mehr hervorgerufen werden. Die Aktivität des Neurons bei Eingangsvariablen, die ausserhalb des spezifischen Antwortbereichs liegen, ist dann bereits so klein, dass kein Hebb´scher Prozes in Gang gesetzt werden kann. Sobald die Mehrheit von Neuronen eines Systems selektive Antworteigenschaften ausgebildet hat, kann dieses System nicht mehr durch plastische Veränderungen auf spezielle Bedingungen der Umwelt reagieren. Dadurch erklärt sich enerseits die zeitliche Beschränkung der kritischen Periode und andererseits der Befund, dass diese Periode in gewissem Ausmass durch Dunkelaufzucht verlängerbar ist.

Die Steuerung der Plastizität nach bestimmten Auswahlkriterien ist zwar offensichtlich gut geeignet, die informationsverarbeitenden Eigenschaften eines Systems erfahrungsabhängig zu verbessern, kann aber nicht dazu dienen, eine Anpassung im Sinne einer Optimierung des Verhaltens zu erreichen. Zum einen hat das Steuersystem aufgrund fehlender Rückkopplung keinerlei Möglichkeit, die Auswirkungen der in Gang gesetzten Veränderungen in seine Entscheidungen mit einzubeziehen und zum anderen beinhaltet der Ausdruck "Optimierung des Verhaltens" viel zu verwickelte Sachverhalte, als dass ein solcher Vorgang mit so einfachen Mitteln zu

erklären wäre. Diese Anpassung setzt auf alle Fälle eine geschlossene Rückkopplungsschleife voraus, in der die Konsequenzen eines bestimmten Verhaltens in einer bestimmten Situation bewertet und dazu verwendet werden, das Verhalten in einer späteren, ähnlichen Situation entsprechend zu korrigieren. Als Voraussetzung dazu muss also ein Gedächtnis vorhanden sein sowie die Fähigkeit, aus ähnlichen, aber nicht identischen Situationen gemeinsame Eigenschaften herauszufiltern. Die hier auftretenden Veränderungen beziehen sich vermutlich nicht wie oben auf die Verbesserung irgendwelcher Funktionen sondern mehr auf die erfahrungsbedingte Auswahl aus bereits bestehenden Möglichkeiten, die dann bei Erfolg bevorzugt " gemerkt " und möglicherweise weiter ausgebaut werden. Solche Effekte spielen sich auf einer Ebene der Hierarchie ab, die sich der gezielten experimentellen Untersuchung gegenwärtig noch nicht erschliessen lässt. Es ist beispielsweise schon sehr schwierig Dinge wie "erfolgreiches Verhalten " oder "assoziative Voraussicht " so objektiv zu definieren, dass sie als Parameter in einen Versuch mit einbezogen werden können. Eine Möglichkeit, diesem Problemkreis etwas näher zu kommen, bietet unter Umständen das Finden von Erklärungen für die Funktion niederer Stufen der Hierarchie.Es ist zu erwarten, dass sich die Algorithmen der höheren Ebenen auf denselben grundlegenden Gesetzmässigkeiten aufbauen, die auch auf niederen Verarbeitungsstufen Gültigkeit besitzen.

Literaturverzeichnis

Agrawal, H.C., and A.N. Davison 1973 Myelination and Amino Acid Imbalance in the Developing Brain. In: Biochemistry of the Developing Brain Vol. I. W.Himwich, ed. Marcel Dekker Inc., New York. , p.p. 143 - 186.

Barlow, H.B., and J.P. Pettigrew 1971 Lack of specificity of neurons in the visual cortex of young kittens.

Berl, S., and D.P. Purpura 1963 Postnatal Changes in amino acid content of kitten cerebral cortex. J. Neurochem. 10, 10: 237-240.

Berl, S., and D.P. Purpura 1966 Regional Development of glutamic acid compartmentation in immature brain. J. Neurochem., 13: 293-304.

Bishop, P.O., J.S. Coombs, and G.H. Henry 1973 Receptive fields of simple cells in the cat striate cortex. J. Physiol. , 231: 31-60.

Blakemore, C., and G.F. Cooper 1970 Development of the brain depends on the visual environment. Nature, 228: 477-478.

Bock, E., and K. Mollgard 1982 Marker proteins in developing nervous system. Int.I.Develop.Neurosc., Suppl.: 54.

Buisseret, P., and E. Gary-Bobo 1979 Development of visual cortical orientation specificity after dark-rearing: role of extraocular proprioception. Neurosci.Lett., 13: 259-263.

Buisseret, P., E. Gary-Bobo, and M. Imbert 1978 Ocular motility and recovery of orientational properties of visual cortical neurones in dark-reared kittens. Nature, 272: 816-817.

Changeux, J.P., and A. Danchin 1976 Selective stabilization of developing synapse as a mechanism for the specification of neuronal networks. Nature, 264: 705-712.

Cynader, M. 1979 Role of visual cortex in interocular aligment. Invest.Ophthalmol.Vis.Sci., 18: 742-751.

Cynader, M., and D.E. Mitchell 1977 Monocular astigmatism effects on kitten visual cortex development. Nature, 270: 177-178.

Dichter, M.A., and G.D. Fischbach 1977 The action potential of chick dorsal root ganglion neurones maintained in cell cultur. J.Physiol. (Lond), 267: 281-298.

Dietzel, J., U. Heinemann, G. Hofmeier, and H.D. Lux 1980 Stimulus induced Changes in Extracellular Na+ and Cl- concentration in Relation to Changes of the Intracellular Space. Exp.Brain Res., 46: 73-84

Eckert, R., and H.D. Lux 1976 A voltage-sensitive persistant calcium conductance in neuronal somata of H Helix. J.Physiol. (Lond), 254: 129-192.

Farnbrough, D.M., and P.N. Devroetes 1978 Newly synthesized acetylocholine receptors are located in the Golgi apparatus. J.Cell Biol., 76: 237-240.

Fifkova, E. 1970 The effect of monocular deprivation on the synaptic contacts of the visual cortex. J.Neurobiol., 1: 285-294.

Fulcrand, J., J. Valat, and A. Privat 1982 Sequential Maturation of Oligodendrocytes in the newborn rat optic nerve. Int.I.Develop.Neurosc., Suppl.: 95.

Gardner-Medwin, A.R. 1983 A study of mechanisms by which potassium moves through brain tisssue in the rat. J. Phys., 335, 353-374

Garey, L.J., and J.D. Pettigrew 1974 Ultrastructural changes in kitten visual cortex after environmental modification. Brain Res., 66: 165-172.

Geduldig, D., and D. Junge 1968 Sodium and calcium components of action potentials in the Aplysia giant neuron. J.Physiol. (Lond.) , 199: 347-365.

Geduldig, D., and R. Gruener 1970 Voltage clamp of the Aplysia giant neuron early sodium and calcium currents. J.Physiol. (Lond.) 211: 217-244.

Guillery, R., and D.J. Stelzner 1970 The differential effects of unilateral lid closure upon the monocular and binocular segments of the dorsal lateral geniculate nucleus in the cat. J.comp.Neurol., 139: 413-422.

Haber, B., and K. Kuriyama 1973 Development and Regulation of the gamma-Aminobutyric Acid System in Brain during ontogeny. Biochemistry of the Developing Brain, 1: 111-142.

Hebb, D.O. 1949 The organization of behaviour. John Wiley & Sons, New York.

Heinemann, U., A. Konnerth, and D. Lux 1981 Stimulation induced changes in extracellular free calcium in normal cortex and chronic alumina cream foci of cats. Brain Res., 213: 246-250.

Heinemann, U., and R. Pumain 1980 Extracellular Ca-activity changes in cat sensorimotor cortex induced by iontophoretic application of aminoacids. Exp.Brain Res., 40: 247-250.

Heinemann, U., H.D. Lux, and M.J. Gutnick 1977 Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. Exp.Brain Res, 27: 237-243.

Hirsch, H.V.B., and D.N. Spinelli 1970 Visual experience modifies distribution of horizontally and vertically oriented receptive fields in cats. Science, 168: 869-871.

Hodgkin, A.L., and B. Katz 1949 The effect of calcium on the axoplasm of giant nerve fibres. J.exp.Biol. 26: 292-294.

Horn, R. 1977 Tetrodotoxin-resistant divalent action potentials in an axon of Aplysia. Brain Res 133: 177-182.

Hotson, J.R., and D.A. Prince 1980 A calcium-activated hypoerpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. J.Neurophysiol.. 43: 409.

Hubel, D.H., and T.N. Wiesel 1963 Receptive fields of cells in striate cortex of very young, visually inexperienced kittens. J.Neurophysiol., 26: 994-1002.

Huttunen, M.O. 1973 General model for the molecular events in synapses during learning. Perspectives in Biology and Medicine, : 103-108.

Kostyuk, P.G., O.A. Krishtal, and P.A. Doroshenko 1974 Calcium Currents in snail neurones I Identification of Ca cur ents. PflÜgers Arch. ges. Physiol., 348: 93.

Kostyuk, P.G., and O.A. Krishtal 1977 Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollase neurones. J.Physiol. (Lond.) , 270: 545-568.

Krnjevic, K., E. Puil, and R. Werman 1975 Evidence for Ca 2+-activated K+ conductance in cat spinal motoneurons from intracellular EGTA injections. Can. J. Physiol. Pharmacol., 53: 1214-1217.

Llinas, R. 1979 The role of calcium in neuronal function. In: The Neurosciences Fourth Study Program. F.O.Schmitt, and F.G.Worden, eds. MIT Press, Cambridge Mass, p.p. 555-571.

Llinas, R., and M. Sugimori 1979 Calcium conductances in Purkinje cell dendrites: their role in development and integration. Progr.Brain Res.. 51: 323-334.

Llinas, R., and Y. Yarom 1981 Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. J Physiol. (Lond.). 315: 549-567.

Llinas, R., and Y Yarom 1981 Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones in vitro. J.Physiol. (Lond.), 315: 569-584.

Lux, H.D. and e> Neher 1973 The equilibration time course of K+ in cat cortex. Exp. Brain Res. 17. 190-205.

Meisami, E. 1977 Progress in Brain Research; Maturation of the Nervous Syst., 48: 213-270.

Moolenar, W.H., and I. Spector 1977 Membrane currents examined under voltage clamp in cultured neuroblastoma cells. Science, 146: 331-336.

Movshen, J.A., and I.D. Thompsen 1978 Spatial summation in the receptive fields of simple cells in the cat§ striate cortex. J.Physiol.. 283: 53-77.

Movshen, J.A., I.D. Thompsen, and D.J. Tolhurst 1978 Receptive field organization of complex cells in the cat§ striate cortex. J.Physiol., 283: 79-99.

Nicholsen, Z. and G. Steinberger, Role of Calcium and Potassium Changes in Extracellular microenvironment of Cat Cerebellar Cortex 1978 J.Neurophysiol., 41: 1026-1037.

Nicholson, C., J.M. Phillips and A.R. Gardner-Medwin 1979 Diffusion from an iontophoretic point source in the brain: role of tortuosity and volume fraction. Brain Res. 169,580-584.

Nicholson, C. and J.M. Phillips 1981 Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. J. Physiol. 321. 225-257.

Nicoll, K.A., and B.E. Alger 1981 Synaptic excitation may activate a Ca-dependent potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. Science, 212: 957-959.

Porter, K.P. 1976 Motility in Cells. In: Cell Motility. R.Goldman, T.Pollard, and J Rosenbaum, eds. Cold Spring Harbor Cont. on Cell Proliferation, Long Island, p.p.

1-28.

Purpura, D.P. 1967 Comparative physiology of dendrites. In: The Neurosciences: a study program. G.L.Quarton, T.Melnechulz, and F.O.Schmitt, eds. Rockefeller Univ. Press, New York, p.p. 372-393.

Rauschecker, J.P. 1979 Orientation-dependent changes in response properties of neurons in the kitten$ visual cortex. In: Developmental Neurobiology of Vision. R.D.Freeman, ed. Plenum Press, New York, p.p. 121-133.

Rauschecker, J.P., and W. Singer 1979 Changes in the circuitry of the kitten$ visual cortex are gated by postsynaptic activity. Nature, 280: 58-60.

Rauschecker, J.P., and W. Singer 1981 The effects of early visual experience on the cat$ visual cortex and their possible explanation by Hebb synapses. J.Physiol.(Lond.), 310: 215-239.

Reinoso-Suarez, F. 1961 Topographischer Hirnatlas der Katze. E.Merck AG, : .

Rodan, G.A., L.A. Bourret, and L.A. Norton 1978 DNA Synthesis in Cartilage Cells is stimulated by oscillation el field. Science, 299: 690-692.

Singer, W. 1976 Modification of orientation and direction selectivity of cortical cells in kittens with monocular vision. Brain Res., 118: 460-468.

Singer, W. 1979 Central-core control of visual cortex functions. In: The Neurosciences, Fourth Study Program. F.O.Schmitt, and F.G.Worden, eds. MIT Press, Cambridge, Ma., p.p. 1093-1109.

Singer, W. 1979 Neuronal mechanisms in experience dependent modification of visual cortex function. In: Development und Chemical Specificity of Neurons. Progr.in Brain Res.Vol.51. F.Bloom, M.Cuenod, and G.Kreutzberg, eds. Elsevier, Amsterdam, p.p. 457-477.

Singer, W. 1980 Zentrale Kontrolle neuronaler Plastizitaet in der Sehrinde der Katze. Central gating of developmental plasticity in the cat striate cortex. Verh.Dtsch.Zool.Ges., 1980: 268-274.

Singer, W. 1982 Central core control of developmental plasticity in the kitten visual cortex: I. Diencephalic lesions. Exp.Brain Res., 47: 209-222.

Singer, W., and J. Rauschecker 1982 Central core control of developmental plasticity in the kitten visual cortex: II. Electrical activation of mesencephalic and diencephalic projections. Exp. Brain Res., 47: 223-233.

Singer, W., J. Rauschecker, and R. Werth 1977 The effect of monocular exposure to temporal contrasts on ocular dominance in kittens. Brain Res., 134: 568-572.

Singer, W., F. Tretter, and U. Yinon 1982 Central gating of developmental plasticity in kitten visual cortex. J.Physiol., 324: 221-237.

Singer, W., F. Tretter, and U. Yinon 1982 Evidence for long term functional plasticity in the visual cortex of adult cats. J.Physiol.(in print), 324: 00-00.

Spitzer, N.L. 1982 Studies of the early development of neuronal function. 3rd Int. Meet. of the Int. soc. for Devel. Neurosc., .

van der Loos, H. 1982 Barreloids in mouse somatosensory thalamus. Neurosci. Lett., 2 : 1-6.

van der Loos, H., and J. Dorfl 1978 Does the skin tell the somatosensory cortex how to construct a map of the Periphery. Neurosci. Lett., 7: 23-30.

Vrensen, G. 1977 Ontogenesis of the visual cortex of rabbits and the effects of visual deprivation. Progress in Brain Res., 48: .

Wiesel, T.N., and D.H. Hubel 1963 Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cat$ lateral geniculate body. J.Neurophysiol., 26: 978-993.

Yoon, M.G. 1982 Attraction of the retinal neurites by the co-cultured tectal time explanted from adult goldfish. Int.I.Develop.Neurosc., Suppl.: 233.

Anhang A

Beschreibung der Elektronik

Die für die Durchführung der Experimente erbaute Elektronik sollte die rechnergesteuerte Erzeugung optischer Reize übernehmen, wie sie für die Stimulierung cortikaler Neurone verwendet werden. Diese Reize bestehen meistens aus Einzelbalken einer bestimmten Grösse, Lage und Orientierung, die mit verschiedener Geschwindigkeit über das rezeptive Feld des Neurons laufen oder stationär ein- und ausgeschaltet werden.

Parallel dazu sollte die Steuerung der Reizverteilereinheit (siehe 2.) durch den Rechner ermöglicht werden, um die Applikation dieser Reize programmgesteuert vornehmen zu können. Ausserdem war noch eine Relaiseinheit anzuschliessen, die die Steuerung der Augenklappen oder ähnlicher Geräte vornehmen konnte.

Da die Flimmerverschmelzungsfrequenz des visuellen Systems der Katze relativ hoch liegt (etwa 70 Hz), konnte als Display kein Fernsehmonitor verwendet werden. Die Muster wurden also auf einem X/Y - Display (Hewlett-Packard 1304 A) erzeugt. Die dafür notwendigen X- und Y-Ablenkspannungen wurden von der Elektronik so erzeugt, dass 256 Zeilen pro Bild mit einer Bildfrequenz von 100 Hz entstanden. Für die Mustererzeugung über den Z - Eingang des Displays wurde eine beliebige eindimensionale Funktion (abhängig von der Zeilenkoordinate Y) vorgegeben, die in 256 Werten mit einer Genauigkeit von 8 Bit diskretisiert und in einem Halbleiterspeicher abgespeichert wurde. In jeder Zeile wurde der entsprechende Funktionswert ausgelesen und über eine

Digital-Analog - Wandler mit 12 Bit Genauigkeit in eine Analogspannung verwandelt. Die für die Darstellung von auch in der Länge begrenzten Balken notwendige Modulation in X-Richtung wurde durch einen zweiten Speicher errreicht, der eine Zeile in 256 Punkte auflösen konnte. Ein Ausgangsbit dieses Speichers wird dazu benutzt, das vorgewählte Muster in X-Richtung aus- und einzuschalten, wodurch also eine Eingrenzung des Musters auch in der X-Koordinate möglich war.

Zusätzlich konnten durch zwei zusätzliche Bits des X- und Y-Speichers noch zwei Gruppen von voneinander unabhängigen Rechtecken oder Linien erzeugt werden. Diese Linien kÖnnen beispielsweise in Form eines Rechtecks als Markierung eines Gebiets auf dem Display verwendet werden.

Die Drehung des so entstandenen Musters geschieht durch eine Image Processor (Firma OEM), der gesteuert von einer externen Analogspannung die Ablenkspannungen so mischt, dass das gesamte Bild auf dem Display um einen bestimmten Winkel gedreht wird. Die Erzeugung dieser Analogspannung wird von einem eigebauten zusätzlichen Digital/Analog- Wandler Übernommen (ZN8J), der vom Programm aus geladen werden kann.

Die Verbindung mit dem Rechner wurde durch dessen Digital Eingabe/Ausgabe-Register übernommen (DR11K, 16 Bit und 3 Strobesignale). Parallel zu den Schreib- und Lesevorgängen des Reizmustergenerators selbst wurde noch eine MÖglichkeit geschaffen, über zwei Ausgabe- und ein Eingaberegister zusätzliche digital gesteuerte Geräte (z.B. den Reizverteiler) anzuschliessen. Als Anschlüsse stehen am RMG ausser diesen Steuerausgangen und den Analogspannungsausgängen für das Display noch alle intern erzeugten Spannungen (+/-15 V, +/-5 V, +/-10V Referenz) sowie ein Bildsynchronsignal zur Synchronisation externer Vorgänge. Als

Kontrollmöglichkeit für die Verbindung zum Rechner werden die durch die Interfaceplatine erzeugten Subadressen und Funktionen (siene Punkt A3.) durch Leuchtdioden angezeigt. Auf der Platine 3 steht weiterhin ein Dual-in- Line Stecker zur Verfügung, auf dem einzelne Signale zu Testzwecken herausgeführt wurden.

In den folgenden Punkten soll die Funktionweise der Elektronik genauer erläutert werden. Dazu dienen die Schaltpläne in Bild A1. und A2. Die in diesen Bildern neben den einzelnen Bausteinen gemachten Angaben (z.B. A1. D4 etc.) beziehen sich auf die Position des betreffenden ICs au der jeweiligen Platine. Die Ängaben über die Verbindungen an den Bus beziehen sich auf die rückwärtigen Stecker, die die Verbindund zwischen den einzelnen Platinen übernehmen.

A1. Erzeugung der Ablenkspannungen

Die diese Spannungen erzeugende Schaltung ist auf Platine P1 untergebracht und in Bild A1. gezeigt.

A1.1 Synchronsignale

Zur Synchronisation der Vorgänge auf den Platinen wird ein Quarz - Oszillator (Frequenz 10 MHz , SN74S124) verwendet, dessen Ausgangssignal durch die Serienschaltung zweier Zähler (SN74393 und SN74192) durch 16 bzw. 10 geteilt wird. Der Carry - Ausgang des SN74192 mit einer Breite von 1.6us wird zugleich als Zeilensynchronsignal verwendet. Dieses Signal wird durch einen weiteren Zähler (SN74393) durch 256 dividiert und mit dem entstehenden Signal alle 256 Zeilen ein Monoflop SN74123 ausgelöst, dessen

Ausgang das Bildsynchronsignal darstellt. Die Zeilensynchronsignale werden zugleich als Takt für den Adressenzähler für den Musterspeicher GY (3x B2101A 2) verwendet. Der Adressenzähler für den X-Speicher (93L422) wird durch den Ausgang des Oszillators direkt getaktet.

A1.2. Sägezahnspannungen

Die Ablenkspannungen selbst werden durch je eine Integrationsschaltung mit einem Operationsverstärker (LF 356N) erzeugt. Die Synchronisation der Signale geschieht durch Schliessen eines Analogschalters (TL604 TC), der, durch das jeweilige Synchronsignal gesteuert, die Integratoren auf 0 zurücksetz. Diese Ausgangssignale werden dann durch einen weiteren Operationsverstärker auf die notwendige Amplitude verstärkt und so verschoben, dass sie nullpunktsymmetrisch sind (Einstellung durch Trimmpotentiometer). Die daraus resultierenden Signale stehen auf der Dataway auf Leitung A 21 (X-Ramp) und A 23 (Y-Ramp) zur Verfügung. Von dort werden sie als Inputsignale für den Image-Rotator auf Platine 2 verwendet. die von diesem erzeugten gemischten Signale sind von zwei BNC-Buchsen auf der Frontplatte von Platine 2 abzunehmen.

Es besteht noch die MÖglichkeit, zur Verbesserung der Bildqualität im Zeilensprungverfahren mit 512 Zeilen zu operieren, Dazu wird bei jedem zweiten Bild, gesteuert durch eine Flip-Flop, eine kleine Spannung auf das Y-Signal aufzuaddiern und so alle Zeilen dieses Bilddurchlaufs um etwa den halben Zeilenabstand zu verschieben. Dieser Vorgang wird durch Bit 2 des Statusregisters (SRG) gesteuert.

A2. Bildsignal

Das Helligkeitssignal (Z - Eingang des Displays) wird digital erzeugt und durch einen Analog-Digital - Wandler auf Platine 2 in ein Analogsignal umgesetzt. Dabei kann die Polarität und die Darstellung als Two's Complement oder Integer-Wert durch entsprechende Wahl von Bit 3 bis 5 des SRG gewählt werden. Das Bildmuster wird tabellarisch in einem 256x12 Bit Speicher abgespeichert (3xB2101A 2), die X-Ausdehnung des Musters wird durch Bit 3 des FX-Speichers bestimmt (93L422, 4 Bit). Innerhalb dieses Bereichs wird in jeder Zeile der Ausgang des GY-Speichers über den 2 zu 1 Multiplexer (SN74257)auf den Eingang des DAC gelegt. Ausserhalb dieses Bereichs ist der Umschalter auf den Ausgang eines 8-Bit Speichers (SN74373) geschaltet, der dadurch die Helligkeit der Umgebung bestimmt. Während der Dauer des Austastsignals (Bildsynchronsignal) wird der Enable-Eingang des D/A-Wandlers auf 0 gelegt, wodurch die Ausgangsspannung in diesem Intervall 0 V beträgt.

Zur Rahmenmarkierung werden die Bits 1 und 2 von GY und FX verwendet. Durch eine UND-Verknüpfung dieser Bits zusammen mit einer nachgeschalteten ODER-Schaltung wird erreicht, dass bei Zusammentreffen der entsprechenden Bits die Multiplexer auf den Zustand " High Impedance " geschaltet werden, wodurch am Eingang des DAC das Signal " 11111111 " erscheint. Dadurch ist die Ausgangsspannung des DAC maximal (oder minimal je nach Schaltung der entsprechenden Statusbits im SRG) und es erscheint ein heller (oder dunkler) Punkt auf dem Bildschirm. Diese Funktion ist durch Bit 1 des SRG ein- und auszuschalten.

A3. Computerinterface

Die Verbindung zum Rechner wird durch ein digitales Ein- Ausgabe-Interface (DR11K, 16 Bit + Strobe- und Handshakesignale) hergestellt. Der eigentliche Datentransfer von und zum RMG läuft immer in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt wird durch die Ausgangsleitungen des Computers ein Wert übertragen, der von der Interfaceplatine des RMG als Subadressen- und Funktionsabgabe intepretiert wird. Das heisst, dass die untersten 4 Bit des übertragenen Datenworts als Subadresse zwischengespeichert werden, die nächsthöheren 4 Bits als Funktionsangabe (Diese Werte werden durch die Leuchtdioden kontinuierlich angezeigt). Die Unterscheidung zwischen Adressen- und Funktionstransfer und einer Datenübetragung geschieht dabei durch die Benutzung der beiden Data - Ready Signale des DR11K. Wird nämlich der Ausgangsport durch ein Byte-Befehl (MOVB) statt einen Worttransferbefehl (MOV) angesprochen, so wird nur eines der beiden Signale aktiv, bei einer MOV - Instruktion dagegen beide.

Im nächsten Schritt schreibt oder liest der Computer mit einem normalen Befehl über die Ports. Die Dekoderplatine erzeugt nun ihrerseits intern je nach vorher eingegebener Funktion Strobesignale, die die eingegebene Subadresse auf den Schreib- oder Lesebetrieb umschalten und die Datenleitungen entsprechend auswählen. Zusätzlich werden noch nach jedem Schreib- oder Lesevorgang Taktsignale erzeugt, die die Adressenzähler der Speicherbausteine weiterschalten können. Auf diese Weise kann der Computer nach einem einzelnen Vorbereitungsschritt die Speicher mit 256 Schreibbefehlen laden bzw. mit 256 Lesebefehlen auslesen. Dadurch kann ein Speicherinhalt in der Bildaustastlücke vollständig geändert werden, ohne die Bildmustererzeugung zu behindern.

Anhang B

Beschreibung fuer das Messprogramm MESS4.FOR

Allgemeines

Mit diesem Programm koennen bis zu 16 Analogspannungen und ueber den Schmitt-Trigger 3 ein Ereigniszählerkanal aufgenommen werden. Alle möglichen Messkanäle sind in Bezug auf ihre Parameter völlig unabhängig voneinander. Dabei koennen für jeden Kanal einzeln folgende Parameter eingestellt werden:

Vorlauf (='VORL')	Abstand vom Triggerereignis bis zum Start der Messwertaufnahme
Binbreite ('BINW)	Abstand der einzelnen Messpunkte voneinander
'ANZM'	Anzahl der Messpunkte
Kanalnummer (=NKAN')	Nummer des Analog-Eingangskanal (von 0 bis 15) bzw Ereigniszaehler (NKAN=16).

Die oben angegebenen Zeiten (in 'VORL' und 'BINW') werden in internen Einheiten angegeben (Parameter 'UNIT'). Diese Einheit, gemessen in Mikrosekunden, ist fuer alle Kanaele identisch und muss vor Beginn der Messung definiert werden.

Die maximalen Abtastraten betragen etwa 70 Mikrosekunden pro angegebenen Kanal, wozu noch 50 Mikrosekunden 'Overhead' addiert werden. Fuer schnellere Messungen besteht die

Moeglichkeit, unter Verzicht auf die freie Waehlbarkeit der Parameter fuer jeden Kanal einzeln die Eingangskanaele in einer nicht interruptgetriebenen Schleife direkt einzulesen. Dazu wird (mit der Kanalnummer NKAN=20) ausgehend von Kanal 0, eine bestimmte Anzahl von Kanaelen abgefragt und deren Werte in den Messwertespeicher uebergeben. Dabei wird vorausgesetzt, dass diese Kanaele dann die gleiche Anzahl von Messpunkten haben und mit der gleichen Abtastrate vom gleichen Zeitpunkt ab eingelesen werden. Die dabei erreichbare Geschwindigkeit betraegt bei einem Kanal (nur Kanal 0) etwa 26 Mikrosekunden, bei mehreren Kanaelen etwa 45 Mikrosek. pro Kanal. Bei nur einem Kanal kann die Messzeit durch den Parameter 'FTIM' um jeweils 7 Mikrosekunden bei einer Vergroesserung von FTIM um 1 verlaengert werden.

Das Triggerereignis, nach dem ein Messzyklus beginnt, kann auf drei verschiedene Arten definiert werden:

Triggermodus (='TMOD') =0 Sofortiger Start nach Eingabe des Befehls STRT`

TMOD =1 Hier wird nach dem Startbefehl der Analogkanal 'TKAN' dauernd ueberprueft, bis die an ihm gemessene Spannung die eingestellte Schwelle 'TLEV' ueberschreitet, worauf der Messzyklus gestartet wird.

TMOD =2 Bei diesem Modus wird ein Messzyklus begonnen, sobald der Schmitt-Trigger 1 ausgelöst wird

Ein Messzyklus besteht darin, dass jeder Kanal nach seiner Vorlaufzeit nach jeweils 'BINW' Zeiteinheiten abgefragt und das Ergebnis im Messwertearray abgelegt wird, bis die letzte der 'ANZM' Messungen durchgefuehrt wurde. Hat der letzte Kanal seine Messungen ganz durchgefuehrt, ist der Zyklus beendet. Fuer Mittelungen besteht die Moeglichkeit, diesen Messzyklus wiederholt durchzufuehren (Parameter 'AVER' = Anzahl der Mitteilungen), wobei die Messwerte dann jeweils auf die vorhandenen aufaddiert werden. Dabei ist zu beachten, dass wegen der beschraenkten Wortlaenge nach 16 Mitteilungen bei jeweils maximalem Eingangswert die Gefahr des (unkontrollierten) Ueberlaufs besteht.

Eingabemoeglichkeiten

Nach dem Start des Programms meldet sich dieses mit dem Prompt 'MESS4' und erwartet die Eingabe einer Anweisung. Diese kann entweder ein Kommando oder ein Parameterbefehl sein. Ein spezielles Kommando ist '§µFilename°', das zur Folge hat, dass sich das Programm seine weiteren Anweisungen aus der Datei 'µFilename°' holt. Es koennen beliebig viele, durch ein Komma getrennte Anweisungen auf eine Zeile geschrieben werden. Wird nach einer fehlerhaften Anweisung eine Fehlermeldung ausgedruckt, wird der Rest der Zeile nicht mehr durchgefuehrt.

Parameteraenderungen

Alle im Programm verwendeten Parameter und Kommandos bestehen

aus 4 Buchstaben. Der Wert eines Parameters wird dadurch veraendert, dass man eingibt µPara°=µZahlenwert°, wobei µPara° die vierbuchstabige Abkuerzung fuer den Parameter ist und µZahlenwert° die Integerzahl, die dem neuen Parameterwert entspricht. Durch 'µPara°?' wird der aktuelle Wert des Parameters ausgedruckt.

Parameter koennen noch durch zwei andere Kommandos veraendert werden: 'µPara°*µReal-Zahl°' und 'µPara°+µReal-Zahl°'. Diese beiden Kommandos multiplizieren den Parameter mit der eingegebenen Real-Zahl (also eine Zahl mit Dezimalpunkt), bzw addieren diese Zahl zu diesem Parameter, wobei auch negative Zahlen benutzt werden koennen.

Bei jeder Aenderung eines Parameterwertes wird der neue Wert auf die Gueltigkeit, d.h. auf die Einhaltung der oberen und unteren Grenzen ueberprueft und gegebenenfalls eine Fehlermeldung abgegeben, wobei der Parameter seinen alten Wert behaelt.

Die vorhandenen Parameter sowie ihre Grenzen und ihre aktuellen Werte koennen mit dem Kommando 'HELP' ausgedruckt werden.
Beispiele für Parameteränderungen:

```
MESS4° UNIT=1000
MESS4° UNIT?
 UNIT = 1000
MESS4° UNIT + 200.,UNIT?
 UNIT = 1200
MESS4°
```

Kommandos

Programminterne Kommandos

Diese Kommandos haben in Bezug auf die Messung keine Funktion sondern sind nur fuer den Dialog mit dem Programm von Bedeutung.

'TRON' Nach diesem Kommando werden alle eingegebenen Kommandos vom Programm wiederholt. Diese Funktion ist nuetzlich, um die Durchfuehrung eines indirekten Kommando-Files zu ueberwachen.

'TROF' Macht 'TRON' rueckgaengig

'TAKE' Eroeffnet einen indirekten Kommandofile, dessen Name unmittelbar danach eingegeben werden muss.
Beispiel: 'TAKE KOM1.PAR' liest die naechsten Anweisungen aus dem File KOM1.PAR. Identisch mit '§ Kom1.PAR', nur dass bei'§' bei fehlender Extension automatisch '.CMD' angenommen wird, waehrend bei 'TAKE' die Extension auf alle Faelle angegeben werden muss.

'§' siehe 'TAKE'

'SAVE' Bei 'SAVE' µFilename°' werden die momentan vorhandenen Parameter in den File µFilename° ausgeschrieben. Aus diesem File koennen sie dann wieder mit 'TAKE' eingelesen werden.

'WAIT' Nach der Eingabe von 'WAITµRealzahl°' wartet das Programm mit der Durchfuehrung des naechsten Befehls die angegebene Zeit von Sekunden µauf .1 Sekunden genau°. Diese Warteschleife kann durch die

Eingabe von 'Return' (Zeilenvorschub) abgebrochen werden.

'REPT' 'REPT µN°' wiederholt die Durchfuehrung einer eingegebenen Anweisungszeile µN° mal (N=Integerzahl).
Beispiel: MESS4° PAR1?,PAR1+2.,REPT5
Diese Zeile hat zur Folge, dass der aktuelle Wert des Parameters PAR1 5 mal hintereinander ausgedruckt und um 2 vergroessert wird.

'DEFC' Nach 'DEFCµFilename°' wird ein File µFilename° eroeffnet, in den beliebig viele Kommandozeilen eingeschrieben werden koennen. Diese Zeilen werden vom Programm einzeln abgefragt. Eine Eingabe '/' am Zeilenanfang schliesst den File. Wird beim Filenamen keine Extension angegeben, wird automatisch'.CMD' ergaenzt. Die in diesen File eingeschriebenen Kommandos lassen sich dann wieder mit '§µFilename°' bzw 'TAKEµFilename° durchfuehren.

Befehle fuer den Messablauf

'EING' Nach diesem Befehl fragt das Programm alle zur Definition eines Messvorgangs notwendigen Parameter ab. Es wird definiert: 'UNIT' =Zeiteinheit in Mikrosekunden Anzahl der Messkanaele, wobei die schnelle Messroutine (NKAN=20) unabhaengig von der Anzahl der in ihr abgefragten Eingangskanaele nur als ein Kanal gilt, sowie dann fuer jeden Kanal die Kanalnummer und die Messparameter Vorlauf,Binbreite und Anzahl der Messpunkte. Zusaetzlich wird noch der Triggermodus und

die Anzahl der Mitteilungen und der Messdurchlaeufe insgesamt (Parameter 'LOOP') bestimmt. Daran anschliessend werden diese Angaben auf Gueltigkeit ueberprueft und nochmals insgesamt dargestellt (Darstellungsweise siehe Kommando 'CHCK'

'MODI' Mit diesem Kommando lassen sich die Paramter eines einzelnen Messkanals (Kanalnummer ist Parameter 'KANA') veraendern. Initialisiert die Messroutine (nur fuer

'INIT' Testzwecke) Startet die Messung. Je nach Triggermodus wird der Messzyklus entweder sofort gestartet oder das

'STRT' Programm wartet auf das Triggerereignis (Anzeige durch ein kleines Quadrat in der linken unteren Ecke des Tektronix-Displays. Nach der Triggerung wird dann die Messwertaufnahme gestartet. Ist dabei der Parameter 'DISP' (=PARAM(53)) ungleich 0, wird waehrend der Messung der Inhalt des Messwertebuffers auf dem Display dargestellt. Nach Ablauf der gewaehlten Zahl von Mitteilungen (Param. 'AVER') wird, falls der Parameter 'TEST'=0 ist, der Messwerteblock auf den Massenspeicher ausgeschrieben (Eroeffnung des Files durch das Kommando 'FILE' bzw durch Abfrage beim ersten Ausschreibeversuch). Ist 'TEST' ungleich 0 und die Anzahl der Messdurchlaeufe (Parameter 'LOOP') groesser als 1, wird der Messwertebuffer geloescht und ein neuer Messzyklus gestartet (nach dem Triggerereignis). Während der Messung können die gemessenen Werte auf dem Speicherbildschirm kontinuierlich dargestellt werden, wobei (durch den Parameter SMOD gesteuert) entweder im Speicher- oder im Refreshmodus gearbeitet wird.

'STOP' Waehrend eines Messzyklus kann dieser durch den Befehl 'STOP' abgebrochen werden.

'TRIG' Dieses Kommando erlaubt das Testen der Triggereinstellung. Dabei wird bei jedem festgestellten Triggerereignis der Buchstabe 'T' ausgedruckt. Die Testschleife kann durch Eingabe von 'RETURN' abgebrochen werden.

'CLRM' Loescht den Datenbuffer und die eingestellten Messparameter sowie das Array 'TARR' (siehe Kommando 'MERK').

'TRAN' Transferiert den aktuellen Messwertebuffer in ein virtuelles Array 'VWERTE', und zwar an den durch den Parameter 'VANZ' gegebenen Platz. 'VANZ' wird dabei inkrementiert, ein etwa oberhalb dieser Stelle in VWERTE liegender Messwerteblock wird ueberschrieben. 'TRAN' transferiert den gesamten Messwerteblock mit saemtlichen Kanaelen, nach dem Kommando 'SHOW' (siehe dieses) koennen dann aber die Kanaele einzeln aus VWE in den Displaybuffer eingeschrieben und dargestellt werden. Mit 'TRAN' lassen sich einzelne Messungen (maximal 22000 Messpunkte) zwischenspeichern, um spaeter direkt verglichen werden zu koennen.

'SHOW' Erlaubt die Darstellung und teilweise Verarbeitung von Messwerten, nach dem Kommando 'SHOW' wird zuerst der

aktuelle Messwerteblock dargestellt. Das Programm befindet sich dabei in einem eigenen Modus, der die Eingabe von einbuchstabigen Befehlen erlaubt. Dieser Modus wird durch Eingabe von'Q' beendet. Es sind folgende Moeglichkeiten vorgesehen:

'µZiffer° schaltet den aktuellen Buffer (Parameter 'AKTB') um auf einen Wert zwischen 0 und 9 (kenntlich an der Position des Cursorpaares auf dem Display).

'µ(Reihe)' transferiert die Messreihe 'Reihe' aus dem Virtualbuffer VWERTE in den aktuellen Buffer, wobei die nicht betroffenen Displaybuffer entsprechend verschoben werden (Fehlermmeldung, falls der Platz nicht ausreicht).

'*' Multipliziert den aktuellen Buffer mit dem Quotierten aus Parameter 'MULT' durch Parameter 'DIVI'

'/' dividiert durch diesen Wert

'U' verschiebt den aktuellen Buffer um 50 Punkte nach oben

'D' Verschiebung nach unten

'L' loescht den aktuellen Buffer (nur logisch!)

'G' fuehrt mit dem AKT. B. eine 3-Punkt-Glaettung durch

'H' schaltet um auf Histogrammdarstellung, falls der akt. Buffer die Kanalnummer 16 traegt (Ereigniszaehler)

'P' schaltet zurueck auf Punktdarstellung

'S' schaltet das Display in Store-Mode

'N' Zurueckschaltung auf No-Store

'T' schreibt einige Informationen ueber den aktuellen Buffer auf das Terminal aus: Kanalnummer, Anzahl der

Messpunkte, Mittelwert bzw (bei Kanal 16) Gesamtsumme, Position des Cursors, Mittelwert bzw Summe der Punkte, zwischen den Cursors, Y-Verschiebung auf dem Display, sowie die Inhalte der einzelnen Bins von Cursor 1 bis 2. Abbruch des Ausschreibens durch eine beliebige Eingabe.

'Q' beendet den Display-Modus

'FILE' 'FILEµFilename°' eroeffnet den File 'FILENAME' zum Schreiben auf der logical Unit 23.

'CLOS' Schliesst evt offene Files auf Unit 23 (Schreiben) und Unit 24 (Lesen).

'LIES' 'LIESµFILENAME°' eroeffnet den File µFILENAME° und liest den ersten Datenblock ein. Falls schon ein File auf Unit 24 offen ist, wird der Filename ignoriert und ein weiterer Datenblock eingelesen.

'SCHR' Schreibt den aktuellen Datenblock auf einen offenen File auf Unit 23 aus. Beim ersten Datenblock werden zusaetzlich die Messparameter ausgeschrieben. Wird kein Filename angegeben und ist noch kein File auf Unit 23 eroeffnet, wird der Filename abgefragt. Ist schon ein File offen, wird ein evt. angegebener Filename ignoriert und auf den File ausgeschrieben.

'MERK' Dieser Befehl dient zur Berechnung von Tunigkurven oder aehnlichem. Dabei wird die Summe der Messreihe mit

NKAN=16 (Ereigniszaehler) in das Array 'TARR(BETA)' eingeschrieben, wobei 'BETA' ein Parameter ist, der beispielsweise die Orientierung eines optischen Reizes angibt (Abfrage und Aenderung als Parameter 'BETA' auf die oben angegebene Weise). Das Array 'TARR' kann mit dem Kommando 'SHOW T' als Polarkoordinatenplot auf dem Display dargestellt werden.

'SHOWT' Darstellung des Arrays 'TARR' in Polarkoordinaten im Storemode auf dem Display

Anhang C

Erklaerung zum Auswerteprogramm AUSWER.FOR

Auswerteprogramm fuer Datenfiles, die mit dem Programm MESS4.FOR erstellt wurden. Es werden einzelne Kanaele aus dem MWERTE-ARRAY, das vom Massenspeicher eingelesen wird, in den virtuellen Wertespeicher YWERTE(2000) uebertragen (Befehl 'TRAN'). Die in diesem Array enthaltenen Messreihen koennen einzeln (Glaettung, Multiplikation, Division, Addition oder Subtraktion von Zahlen, Bincollapse) oder zu mehreren (Mittelwertbildung, Addition oder Subtraktion von Messreihen) verarbeitet werden. Die dabei entstandenen Daten (einschliesslich evt. berechneter Mittelwerte und der zugehoerigen Standardabweichungen) koennen dann wieder auf die Diskette ausgeschrieben werden (Befehl 'SCHR µFILEN°, Extension automatisch .ASW).

Die Eingabe und Aenderung von Parametern ebenso wie die Befehlseingabe und die programminternen Befehle sind indentisch zu den in Anhang B fuer das Messprogramm erklaerten.

Erklaerung der einzelnen Befehle:

CHCK Erlaubt die Darstellung der Messparameter des Messwerteblocks, der als letztes eingelesen wurde.

CLRV Loescht nach Rueckfrage den Parameterblock des virtuellen Buffers sowie den Buffer selbst.

CLRR Loescht (ohne Rueckfrage) den Inhalt aller Rechenregister

CLRM Loescht (ohne Rueckfrage) den Inhalt des aktuellen Messwerteblocks

CLRD Loescht den Display-Buffer

TITL Liest eine Ueberschrift von maximal 80 Byte Laenge ein, die bei STOR=1 auf den Bildschirm ausgeschrieben wird.

STRT Startet die Darstellungsroutine, die mit einer Interruptgetriebenen Routine den Inhalt des Display-Blocks auf dem Bildschirm darstellt. Naehere Beschreibung der moeglichen Befehle siehe unten.

DEFC Erlaubt die Definition neur Kommandos, indem eine Reihe von vorhandenen Befehlen in einen indirekten Command File ausgeschrieben werden. Vorgehen: Eintippen von 'DEFC µFILNAM.EXT° wobei FILNAM.EXT der Name ist, unter dem das Kommando spaeter abgerufen werden soll, die Extension ".EXT" kann weggelassen werden und wird dann automatisch als ".CMD" angenommen. Nach der Aufforderung "Kommandos:" koennen nun beliebig viele Zeilen von Befehlen eingegeben werden. Die Eingabe wird abgeschlossen durch Eintippen von"/" in den Anfang der letzten Zeile. Mit dem Kommando "TAKEµFILNAM° oder kuerzer "$µFILNAM° werden die eingegebenen Befehle ausgefuehrt.

INSP Schreibt die Parameterarrays MPARO, DPARO und VPAR auf das Terminal zu Ueberpruefungs- und Testzwecken aus.

DUMP Schreibt den aktuellen Buffer 'IAKTB' aus und dann bei 'DUMP M' bzw. 'DUMP D' oder 'DUMP V' die durch IAKTB ausgewaehlten Bereiche aus MWERTE, DWERTE oder VWERTE. 'DUMP R' schreibt alle 20 Register des Arrays Regist (20,20) aus.

'DUMP T' schreibt die in 'TERR' mit dem Befehl 'MERK' gespeicherten Werte aus.

MERK Berechnet die Summe der BINS zwischen den durch die

Parameter 'CUR1' bzw 'CUR2' angegebenen Positionen, falls die angegebene Messreihe in DWERTE einen Kanal mit NKAN=16 hat (es wird immer der erste vorhandene Kanal ausgewertet). Die berechnete Summe wird im Array TARR mit Index BETA (=Parameter 'BETA') abgespeichert dieses Array kann mit dem Befehl 'SHOW T' dargestellt bzw mit 'DUMP' ausgedruckt werden.

TRAN 'TRAN µN1°- µN2°' transferiert den Inhalt des Kanals µN1° von MWERTE in den virtuellen Speicher als Messreihe µN2°. Wird µN2° nicht angegeben, wird die Messreihe an die erste freie Stelle im virtuellen Buffer geschrieben. Beim Transferieren wird der Mittelwert bzw (bei Kanal 16 = Histogramm) die Gesamtsumme berechnet und mit der I/O-Kanal-Nummer und der Anzahl der Messwerte in VPAR (N,VREI) abgelegt. Nach Vollzug wird die Meldung 'Transfer in Reihe (VREI)' abgegeben.

GLAT Glaettet die Messreihe 'VREI' in VWERTE, falls vorhanden, analog zum Befehl 'G' in der Darstellungsroutine.

COMP Berechnet von der Position 'CUR1' bis zu 'CUR2' (Parameter) Mittelwert bzw Summe (fuer Histogramme) der Messwertereihe 'VREI' aus VWERTE und traegt diesen Wert in Register (VREI, INDX) ein. Dabei sind 'INDX' und 'VREI' ebenso wie 'CUR1' und 'CUR2' frei waehlbare Parameter. Die Parameter 'PAR1' und 'PAR2' koennen zur Modifikation der Rechenroutine verwendet werden (beispielsweise Angabe des Bereichs, aus dem eine Antwort ausgewaehlt oder ein Baseline-Wert berechnet werden soll).

SHOW Zeigt die Messwerte im Array MWERTE auf dem Scope, dabei bestimmt der Parameter 'ABST' den Abstand der einzelnen Arrays, SMOD den Mode (0=Normal, 1=Fast Intensity). Dieser Befehl dient zur Ueberpruefung der aktuellen Besetzung des MWERTE-Buffers nach dem letzten Lese-Vorgang. 'SHOW T' zeigt das Array 'TARR' in Polarkoordinaten auf dem Display an.

CLOS Schliesst einen evt. offenen File auf Unit 23.

LIES 'LIES µFilnam.Ext°' liest aus dem File einen Datenblock ein, falls nicht schon ein anderer geoeffnet ist. Meldung bei Ende des Files.

SCHR 'SCHR µFilnam°' schreibt den aktuellen Auswerte- und Parameterblock auf den File aus, und eroeffnet den File, falls er nicht schon offen ist. Wird kein Filename angegeben, wird dieser abgefragt. Wird ein Filename angegeben und es ist schon ein File eroeffnet, wird in den offenen File geschrieben und kein neuer File erzeugt. Die Extension wird automatisch als '.ASW' angenommen.

STRT Kommando zum Beginn der Display-Routine, Beschreibung siehe unter Funktion der Darstellungsroutine.

Nach Eingabe des Kommandos 'STRT' beginnt der Darstellungsteil des Auswerteprogramms. In diesem Teil koennen einzelne Messwertreihen aus dem Virtual-Buffer VWERTE, in die sie nach dem Einlesen von Messwertbloecken mit dem Befehl "TRAN" transferiert wurden, in den Display-Buffer eingeschrieben und dargestellt werden. Diese Messreihen koennen dann mit den unten angegebenen Befehlen weiter verarbeitet werden. Die Befehle werden durch druecken der jeweiligen Taste eingegeben (ohne

Carriage Return). Benoetigt das Programm die Eingabe einer u.U. mehrstelligen Zahl, wird dies mit dem Zeichen "*" verdeutlicht. Nach diesem Zeichen muss die jeweilige Zahl eingegeben und mit Carriage Return abgeschlossen werden. Durch Eingabe von "Q" wird in das Hauptprogramm zurueckgesprungen.

Die moeglichen Kommandos sind:

(N) Die Eingabe einer Ziffer von 0 bis 9 (ohne Carriage Return) schaltet auf den aktuellen Buffer mit dieser Kennziffer um. Alle Befehle beziehen sich dann auf diesen Buffer.

(N1) Mit diesem Befehl wird eine Messreihe aus dem Speicher VWERTE in den Darstellungsbuffer uebernommen. Nach Eingabe von 'µ' erscheint als prompt '*', wonach N1,eine Zahl zwischen 1 und 30 eingegeben wird (Abschluss mit Carriage Return). Diese Reihe wird dann in den aktuellen Buffer kopiert und auf dem Display dargestellt. Existiert die Reihe nicht, kommt die Fehlermeldung '?'.

° '°(N1)': Zurueckschreiben des Display-Buffers in VWERTE N1 ist dabei die Zahl, die nach dem prompt "*" eingegeben wird. Wird keine Zahl eingegeben, wird die Messreihe an die alte Stelle in VWERTE geschrieben.

U Verschiebt den aktuellen Buffer nach oben

D Verschiebt den aktuellen Buffer nach unten

* Multipliziert den akt. Buffer mit dem Wert "MULT/DIVI", wobei MULT und DIVI die entsprechend vorher vereinbarten Parameter sind.

/ Dividiert den akt. Buffer durch "MULT/DIVI"

L Loescht den aktuellen Buffer

G Glaettet den akt. Buffer (3-Punkt-Glaettung)

dargestellten Datenreihen einmal auf das Display aus. Zusaetzlich werden einige Informationen mit ausgeschrieben: Eine Ueberschrift mit bis zu 80 Zeichen (Eingabe mit Befehl 'TITL'), Nummer der Reihe in VWERTE, I/O-Kanal-Nummer und die Anzahl der Messwerte.

N Schaltet zurueck auf Non-Store

B Fuehrt Binkollaps durch, die Anzahl der zu kollabierenden Bins wird durch den Parameter 'BINC' festgelegt.

L Loeschen des aktuellen Buffers.

Q Abbruch des Displays

T Schreibt folgende Informationen aus:

AKTB,IREIH,ANZM,I/O-Kanal

Mittelwert des gesamten Buffers, Position Cursor 1 und 2 Y-Verschiebung des aktuellen Buffers.

Summe der Bins von Cursor 1 bis Cursor 2

Inhalt der Bins von Cursor 1 bis 2 (- Y-Versch. aus DPARO (1,IAKTB) Unterbrechung des Ausschreibens durch eine beliebige Eingabe.

H Schaltet um auf Histogramm-Display des aktuellen Buffers, falls dieser die Kanalnummer 16 hat, sonst Fehlermeldung '?'.

P Schaltet zurueck auf Punkte-Display.

E Expandiert den Bereich des aktuellen Buffers zwischen den Cursors auf die gesamte Breite.

. Macht die Expansion rueckgaengig.

A Artefaktausblendung. Der Bereich zwischen den Cursors wird durch eine gerade Verbindung zwischen den Randpunkten ersetzt.

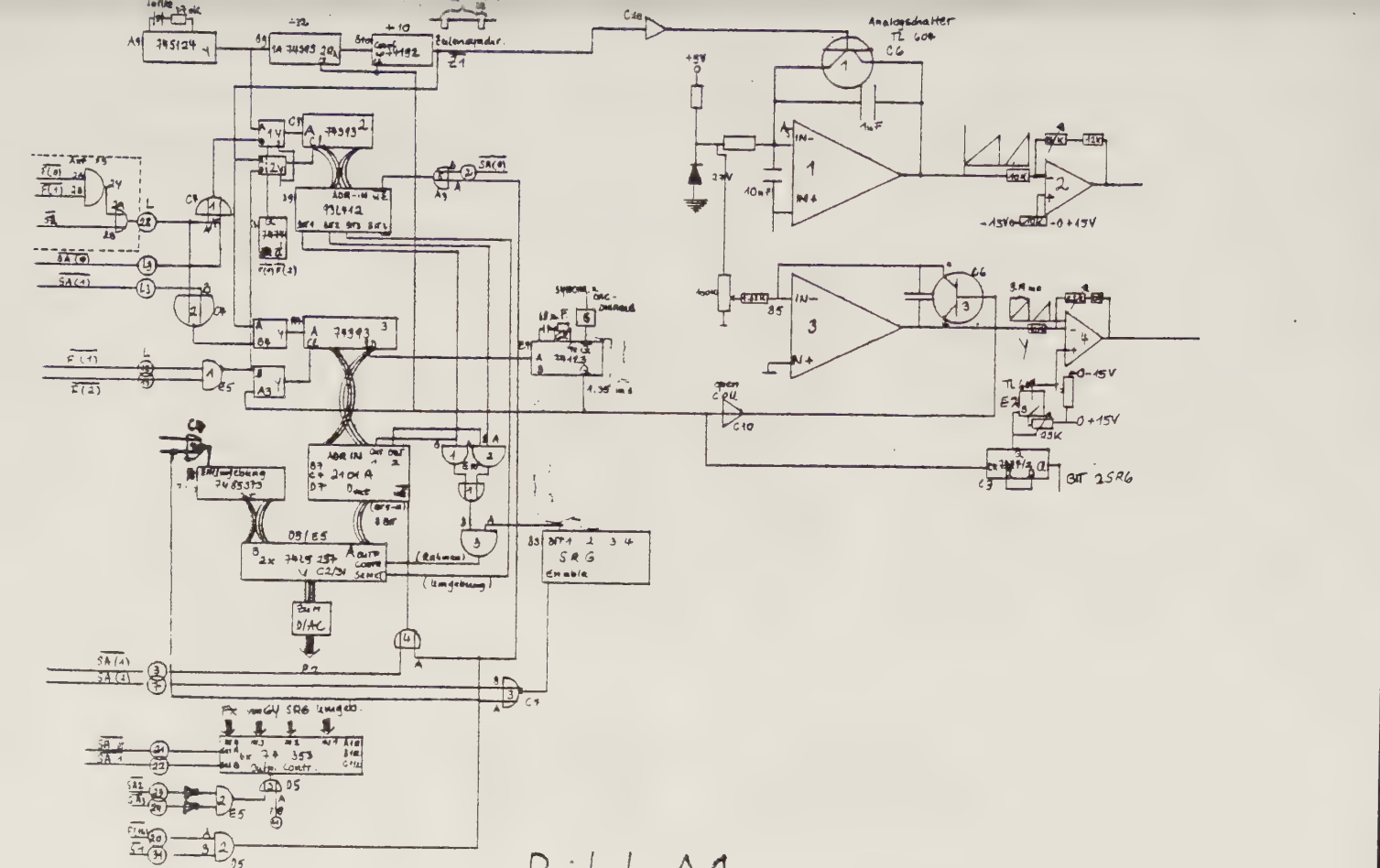
I Fuegt ein beliebiges Geradenstueck in den Bereich

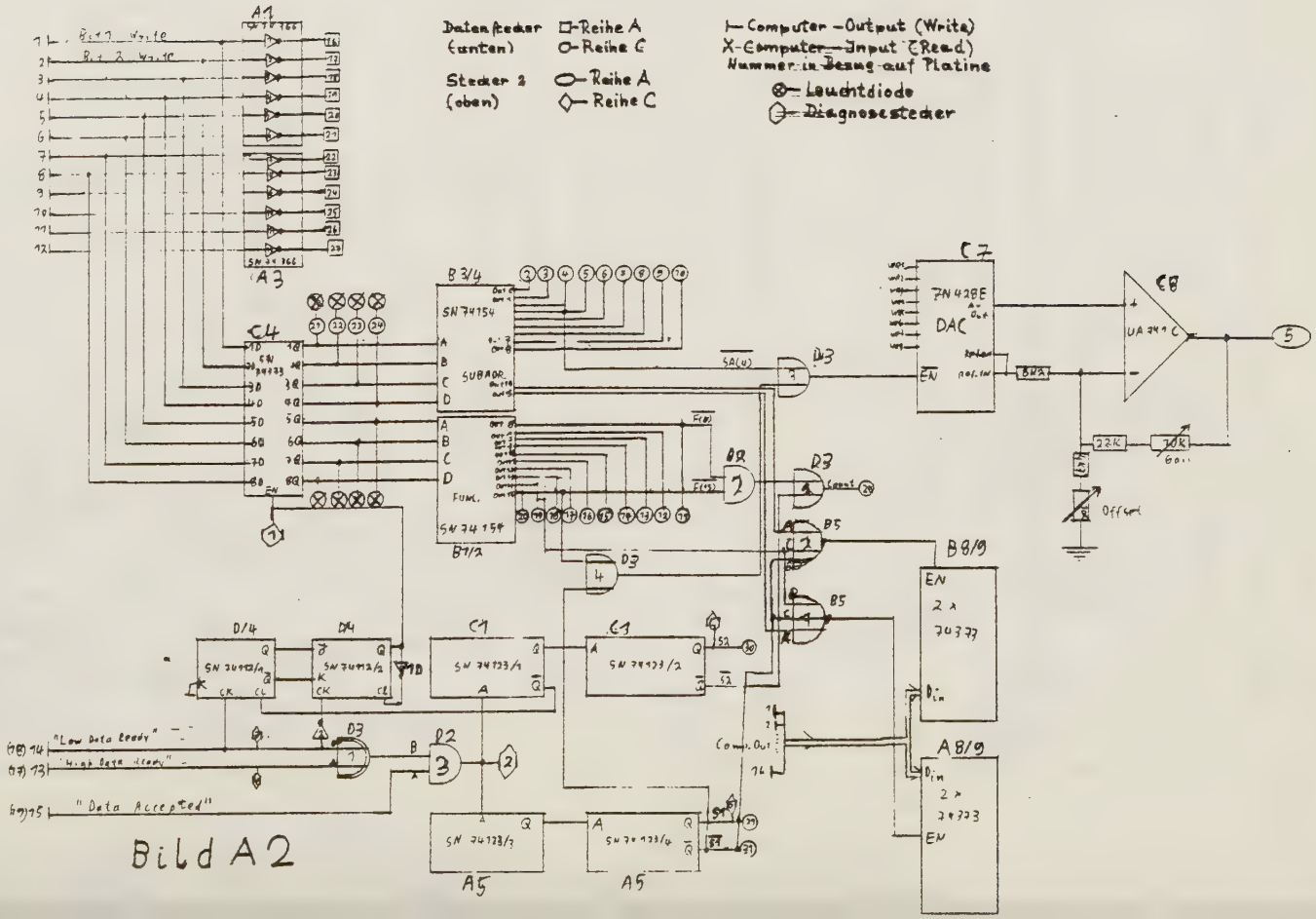
zwischen den Cursors ein. Die Endpunkte des Geradenstuecks werden durch die Analogspannungen der A/D-Kanaele 'KAN3' und 'KAN4' bestimmt und direkt auf dem Display angezeigt. Abschluss des Einfuegens durch Eingabe von Carriage Return.

+(N1) Damit kann der Display-Buffer N1 zu dem aktuellen Buffer addiert werden (Prompt'*' nach Eingabe von '+', Carriage Return nach Eingabe von N1 notwendig).

-(N1) Analog zu '+' kann hier ein Buffer subtrahiert werden.

Wenn eine oder mehrere Messreihen auf dem Display dargestellt wurden, koennen sie in ihrer bearbeiteten Form in eine beliebige Reihe des VWERTE Buffers zurueckgeschrieben und auf dem Massenspeicher zur spaeteren Weiterverwendung abgespeichert werden. Ausserdem koennen die im Store-Mode (Befehl 'S') mit oder ohne zusaetzlichen Text ueber eine Hardcopyeinrichtung ausgegeben werden.


Analogschalter
TL 604
C6
1µF
10nF
2,7V
+5V
IN-
IN+
-15V 0 +15V
0-15V
0 +15V
BIT 2SR6
SRG
Enable
D/AC
(Rahmen)
(Umgebung)
Calendar
Bild A1


Datenstecker (unten)
Reihe A
Reihe C
Stecker 2 (oben)
Reihe A
Reihe C
Computer-Output (Write)
X-Computer-Input (Read)
Nummer in Bezug auf Platine
Leuchtdiode
Diagnosestecker
A1
A3
B3/4
B1/2
C4
C7
C8
D3
B5
B8/9
A8/9
D/4
D4
C1
D2
A5
SN 74154
SUBADR.
Func.
DAC
UA 741 C
"Low Data Ready"
"High Data Ready"
"Data Accepted"
Offset
Bild A2

L E B E N S L A U F

Name: Geiger Vorname: Hans

geb. am 7.3.1952 in Wessobrunn

Vater Hans Geiger, pensionierter Soldat

Mutter Elisabeth, geb. Leidl, Hausfrau

Geschwister 5, davon drei ältere und eine jüngere Schwestern, ein jüngerer Bruder.

Schulischer Werdegang:

September 1958 bis Juli 1962 Volksschule in Wessobrunn, ab September 1962 Besuch des math.-nat. Zweiges des Dominikus-Zimmermann-Gymnasiums in Landsberg/Lech. Von Juli 1964 bis Juli 1965 Aufenthalt mit der gesamten Familie in El Paso/Texas, USA (Lehrgang des Vaters), dabei Besuch der McGoffin-Junior High School. Nach der Rückkehr nach Deutschland wieder Schulbesuch in Landsberg, Abitur im Mai 1972.

Von Juli 1972 bis April 1974 Wehrdienst mit freiwilliger Verpflichtung auf zwei Jahre, die später auf 21 Monate verkürzt wurden. Dabei Ausbildung zum Fernschreiber, Verwendung beim integrierten Dienst der NATO bei der 2. ATAF in Tongeren/Belgien und Maastricht/Holland. Entlassung als Obergefreiter im April 1974.

Beginn des Physikstudiums im Sommersemester 1974. Vordiplom im WS 1975, Diplomarbeit vom April 1978 bis September 1979 am Lehrstuhl für med. Optik der Uni München, Betreuer Prof. Dr. R. Röhler. Das Thema lautete: "Untersuchungen zur elektronischen Erzeugung und visuellen Erkennung zweidimensional separierbarer bewegter Muster". Abgabe der Diplomarbeit und Ablegen der letzten Teilprüfungen (Nebenfach Physiologie, als angewandte Physik Elektronik) im Dezember 1979.

Seit Januar 1980 Doktorarbeit unter Betreuung von Prof. Röhler über das Thema: "Kalziumströme und Lernprozesse der Entwicklung des visuellen Systems der Katze". Diese Arbeiten wurden bis Juli 1982 am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München durchgeführt, danach am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt, jeweils unter der fachlichen Betreuung des jetzigen Direktors des MPI für Hirnforschung, Prof. Dr. W. Singer.

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Röhler an dieser Stelle für die Betreuung dieser Arbeit, für die Diskussionen über deren Durchführung und speziell für seine Unterstützung bei der Lösung der Probleme der zweidimensionalen Diffusionsgleichung. Da es sich bei dieser Arbeit zum grossen Teil um interdisziplinäre Fragestellungen handelt, die eine Einarbeitung in völlig neue Fachgebiete erforderten, schulde ich sehr vielen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, an dem diese Arbeit entstanden ist, grossen Dank für ihre wertvolle Hilfe: Herr Prof. Dr. H.D. Lux, Herr Dr. Uwe Heinemann, Frau Dr. Ulla Mitzdorf, Herr Dr. Günther Neumann, Frau Susanne Zieglgänsberger und viele andere waren stets bereit, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Vor allem aber bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolf Singer, meinem Betreuer während der letzten 3 Jahre, der mir die Anfangsgründe der Neurophysiologie vermittelte und stets sehr viel Geduld auch mit dummen Fragen hatte.